



Universidade Estadual do Ceará
Carolina Sidrim de Paula Cavalcante

**CARACTERIZAÇÃO DAS DERMATOFITOSES CANINA E
FELINA E MANUTENÇÃO DE CEPAS DERMATOFÍTICAS *IN*
*VITRO***

Fortaleza-Ceará

2006

Universidade Estadual do Ceará
Carolina Sidrim de Paula Cavalcante

**CARACTERIZAÇÃO DAS DERMATOFITOSSES CANINA E
FELINA E MANUTENÇÃO DE CEPAS DERMATOFÍTICAS *IN*
*VITRO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial, para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias.

Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal

Orientador: Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha

Fortaleza - Ceará

2006

C376c Cavalcante, Carolina Sidrim de Paula
Caracterização das dermatofitoses canina e felina e
manutenção de cepas dermatofíticas *in vitro* / Carolina Sidrim
de Paula Cavalcante. _ Fortaleza, 2006.
90 p.; il.
Orientador: Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha.
Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) –
Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Veterinária.
1. Dermatofitoses. 2. *Microsporum*. 3. Estocagem. 4.
Gatos. 5. Cães. I. Universidade Estadual do Ceará, Faculdade
de Veterinária.
CDD: 636.089

**Universidade Estadual do Ceará
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias**

**CARACTERIZAÇÃO DAS DERMATOFITOSSES CANINA E
FELINA E MANUTENÇÃO DE CEPAS DERMATOFÍTICAS *IN*
*VITRO***

Autora: Carolina Sidrim de Paula Cavalcante

Defesa em ____/____/____ **Conceito:**

Nota:

Banca Examinadora

Marcos Fábio Gadelha Rocha, Prof. Dr.

Orientador (UECE)

Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante, Profª. Dra.

Co-Orientadora/Examinadora (UFC)

Maria Fátima da Silva Teixeira, Profª. Dra.

Examinadora (UECE)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Miguel e Maria de Fátima, pelo amor, amizade e apoio incondicional.

Aos meus irmãos Rafael e Natália. Meus queridos, a presença, a amizade e o apoio de vocês foram fundamentais nesse momento.

Ao Gustavo, cujo incentivo e admiração me fazem acreditar que posso sempre mais. Obrigada por estar presente em minha vida.

À minha querida avó, Maria Francisca, por todo o amor e por ter feito da sua casa um ambiente acolhedor em todos os momentos.

Ao Mariano e à Ifigênia, que participaram de maneira amorosa, firme e decisiva em todos os momentos de minha vida.

Ao Prof. Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha, pelo constante apoio na execução deste trabalho. Obrigada pela paciência, amizade, e por todas as oportunidades que tem me dado até aqui.

À Sâmia Brilhante e Rossana Cordeiro, vocês são pessoas maravilhosas, sempre dispostas a ajudar e dividir seus conhecimentos. Sem a ajuda de vocês esta dissertação não existiria.

Ao Prof. Dr. José Júlio Costa Sidrim, pelo acolhimento no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM).

Aos meus queridos amigos da Pós-Graduação, Raquel Fontenelle, Francisco Atualpa Júnior, Marilena Prado, Karoline Freire que facilitaram bastante a minha caminhada. Foi importantíssima a presença de vocês.

À Érika Helena, minha querida, muito obrigada por me fazer a todo momento compreender o que significa amizade.

Ao Olavo, Terezinha e Monalisa, pela paciência, disponibilidade, simpatia e ajuda na realização das tarefas.

À CAPES pela importante ajuda financeira ao longo destes dois anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará.

RESUMO

Durante o período compreendido entre Março-2005 e Fevereiro-2006, espécimes clínicos de 174 cães e 28 de gatos, da cidade de Fortaleza-CE, Brasil, foram examinados no Centro Especializado em Micologia Médica (CEMM) da Universidade Federal do Ceará para diagnosticar animais com dermatofitose. Dermatófitos foram isolados em 22 dos 174 (12,64%) espécimes de cães e em 9 dos 28 (32,14%) espécimes de gatos. Os dermatófitos identificados foram o *Microsporum canis* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. O *M. canis* foi o mais frequentemente isolado, em 21 (95,45%) dos cães e em 100% dos gatos. Foi observada uma alta proporção de culturas positivas em gatos com menos de um ano de idade, 43,75% destes foram positivos para dermatófitos. Para os cães nenhuma diferença significativa em relação à idade foi identificada. As raças mais representativas com dermatofitose foram Yorkshire Terriers (35,5%), Poodles (14,3%) Doberman Pinschers (11,8%). Gatos da raça persa foram mais frequentemente representados com dermatofitose (50%). A análise para avaliação da estocagem teve por objetivo principal avaliar diferentes métodos de estocagem para cepas de *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, *T. tonsurans*, isolados de cães e gatos. Um total de 172 cepas de dermatófitos foram mantidas em ágar batata acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO) 10% a -20°C, ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C, ágar batata sem adição de crioprotetores a -20° C, e em solução salina acrescida de óleo mineral a 25°C. As cepas estavam estocadas em diferentes períodos desde Março/2002 (38 meses) a Maio/2004 (12 meses). Os resultados sugerem que para garantir a viabilidade cada cepa de *M. canis* deve ser mantida em pelo menos dois dos métodos de estocagem, ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas a 25°C; e todos os métodos de estocagem podem ser utilizados para preservação das outras espécies de dermatófitos.

ABSTRACT

Over a one year period (March 2005 – February 2006), clinical specimens from 174 dogs and 28 cats, from the city of Fortaleza, Ceará, Brazil, were examined at the Specialized Medical Mycology Center at the Federal University of Ceará to detect animals with dermatophytoses. Dermatophytes were isolated from 22 of the 174 (12,64%) canine specimens and 9 of the 28 (32,14%) feline specimens. The identified dermatophytes were *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*. *M. canis* was the most common species isolated 21 (95,45%) for dogs and 100% for cats. There was a high proportion of positive cultures from cats less than 1 year of age, 43,75% positive for dermatophytes. In dogs no significant differences between the ages were detected. The breeds most representative to dermatophytoses were Yorkshire Terriers (35,5%), Poodles (14,3%), Doberman Pinschers (11,8%). Persian cats showed the highest positivity for dermatophytoses (50%). The main objective of this investigation was to evaluate different methods of storage for strains of *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* and *T. tonsurans*, isolated from dogs and cats. A total of 172 strains of dermatophytes were maintained in different methods of storage, such as potato agar added to 10% dimethyl-sulfoxide at -20° C; potato agar added to glycerol (100%) at -20° C; potato agar at -20° C and saline with a mineral-oil layer 25° C. The strains were stored, different periods between March/2002 (38 months) to May/2004 (12 months). The results suggest that to ensure optimal viability each *M. canis* isolate maintained should be held in at least two methods of storage, potato agar added to glycerol (100%) at -20° C and saline with a mineral-oil layer 25° C; and that todos methods of storage can be used for preservation of others dermatophytes species.

LISTA DE TABELAS e GRÁFICOS

Tabela 1: Prevalência de dermatofitose em cães e gatos na cidade de Fortaleza – CE, no período de Março/2005 a Fevereiro/2006	28
Tabela 2: Prevalência de dermatofitose em cães e gatos relacionada à idade dos animais	29
Tabela 3: Espécies de dermatófitos isolados de cães e gatos com lesões sugestivas de dermatofitose	29
Tabela 4: Macromorfologia das cepas de <i>M. canis</i> isoladas de cães e gatos em agar batata e agar Sabouraud	31
Tabela 5: Descrição dos resultados da viabilidade das cepas de dermatófitos em BHI e em ágar-batata	32
Tabela 6: Resultado em BHI em relação às espécies e ao tipo de estoque	33
Tabela 7: Estatísticas do tempo de estocagem (meses), em relação às espécies, ao tipo de estoque e resultado observado no sétimo dia em BHI	35
Gráfico 1: Resultado em BHI, em relação às espécies e ao tipo de estoque	34
Gráfico 2: Distribuição de frequência do tempo de estocagem (meses), em relação à espécie, <i>M. canis</i> no tipo de estocagem Salina 25°C e resultado observado dia em BHI	36

LISTA DE ANEXOS

Anexo I: Artigo estocagem	57
Anexo II: Ficha epidemiológica	71
Anexo III: Ficha de identificação dermatófitos	73

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetil-sulfóxido
°C	Graus Celsius
mL	Mililitro
N°	Número
pH	Potencial Hidrogeniônico
S/A	Ágar Sabouraud
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Verso da colônia de <i>M. canis</i> em ágar batata.	09
Figura 02: Microcultivo de <i>M. canis</i> com numerosos macroconídios	10
Figura 03: Detalhe do verso da colônia de <i>T. mentagrophytes</i>	11
Figura 04: Micromorfologia de <i>T. mentagrophytes</i>	11
Figura 05: Verso da colônia de <i>M. gypseum</i> em ágar batata.	12
Figura 06: Microcultivo de <i>M. gypseum</i>	12

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Micologia: Abordagem geral	2
2.2 Dermatófitos de importância veterinária	4
2.2.1 Dermatofitose: uma breve apresentação	4
2.2.2 Diagnóstico clínico-laboratorial das dermatofitoses	7
2.2.3 Aspectos epidemiológicos das dermatofitoses	13
2.3 Estocagem de microorganismos	15
2.3.1 Estocagem de fungos: abordagem geral	15
3 JUSTIFICATIVA	22
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA	23
5 OBJETIVOS	24
5.1 Objetivo Geral	24
5.2 Objetivos Específicos	24
6 MATERIAL E MÉTODOS	25

6.1 Estudo epidemiológico	25
6.1.1 Colheita do material	25
6.1.2 Identificação laboratorial	25
6.2 Avaliação da estocagem	26
7 RESULTADOS	28
8 DISCUSSÃO	37
9 CONCLUSÕES	43
10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	57

1. INTRODUÇÃO

Os fungos são microrganismos que estão distribuídos na natureza em todos os habitats, como o ar, o solo e a água, além da microbiota de humanos e animais.

Com o avanço da tecnologia e a melhoria dos recursos de diagnóstico, observa-se um aumento crescente na incidência das micoses, em especial as dermatofitoses, em cães e gatos.

As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos, capazes de colonizar e causar lesões no extrato córneo de animais e do homem. Esses fungos podem ser classificados em antropofílicos, zoofílicos e geofílicos de acordo com a sua evolução adaptativa (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Com isso, a identificação e estocagem de cepas fúngicas vêm sendo cada vez mais estudadas, tendo em vista a necessidade de caracterizar a biodiversidade fúngica de nossa região frente às novas ferramentas que auxiliam no desenvolvimento destas técnicas (ODDS, 1991).

A estocagem de microorganismos é um processo complexo, que auxilia no conhecimento de informações sobre esses agentes patógenos, além de fornecer subsídios para a análise do perfil de sensibilidade dessas cepas frente às drogas antifúngicas disponíveis comercialmente.

Diante disso, diversas metodologias de estocagem vêm sendo descritas para a preservação e manutenção de cepas fúngicas por longos períodos. Entretanto, nenhuma delas é relacionada pela literatura como uma forma definitiva, sendo necessária a utilização de duas ou mais metodologias a fim de garantir a recuperação das cepas de forma eficiente, com a manutenção de sua viabilidade, bem como com a preservação de suas características fenotípicas e genotípicas.

Baseado no exposto, torna-se evidente o importante papel de estudos que visem a caracterização epidemiológica das dermatofitoses canina e felina, assim como, a manutenção adequada de cepas dermatofíticas, haja visto que esta última é fundamental para investigações laboratoriais, no tocante a padronização das características fenotípicas e genotípicas desses microrganismos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Micologia: abordagem geral

Os fungos são microrganismos eucariontes, cuja membrana plasmática é constituída em grande parte por ergosterol, e que possuem parede celular composta de polissacarídeos e, algumas outras macromoléculas. Por aproveitarem a energia contida em ligações químicas dos diversos nutrientes são considerados heterotróficos (SIDRIM & ROCHA, 2004). São microrganismos considerados ubíquos no meio ambiente, sendo impossível erradicá-los (SYMOENS & NOLARD, 1999).

Esses microrganismos podem se reproduzir de duas formas: a assexuada ou anamorfa, e pela forma sexuada ou teleomorfa. Em países considerados tropicais e subtropicais, a maioria dos fungos manifesta apenas a forma assexuada, sendo esta a base para sua classificação taxonômica (RIPOON, 1988).

A caracterização dos fungos pode ser feita de acordo com sua estrutura celular. Nesse caso, temos as leveduras que apresentam estrutura unicelular, arredondada, denominada blastoconídio; e os fungos filamentosos que possuem unidade estrutural denominada hifa. Existe ainda, os fungos dimórficos que se apresentam filamentosos em temperatura ambiente (25°C - 28°C) e leveduriformes à uma temperatura de 37° C (LACAZ *et al.*, 1998).

A maioria das espécies fúngicas apresenta-se na natureza na forma filamentosa. As hifas são estruturas tubulares ramificadas e pluricelulares. Apesar de freqüentemente apresentarem na sua constituição os septos, estes podem não ser vistos como estruturas de separação entre as células uma vez que apresentam um grande número de poros que permitem a passagem de estruturas celulares de uma célula para outra (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Apesar dos fungos, de um modo geral não necessitarem colonizar ou infectar tecidos vivos para se perpetuarem, algumas espécies fúngicas participam da microbiota de homens e animais sem, com isso, lhes causar qualquer enfermidade. Por outro lado, os fungos podem ser agentes de processos infecciosos denominados micoses, bem como, quadros de hipersensibilidade, micetismos e micotoxicoses (LACAZ *et al.*, 1998).

As infecções causadas por fungos parecem ser acidentais, ou seja, sua grande maioria não é contagiosa, mas, adquirida por exposição do indivíduo a uma fonte natural de ocorrência do fungo. Existem na natureza mais de 250 mil espécies fúngicas

conhecidas atualmente. Dentre estas, apenas aproximadamente trezentas foram identificadas, pelo menos uma vez, em processo patológico em seres humanos ou animais (LOPES *et al.*, 2004).

As micoses podem ser classificadas clinicamente em sistêmicas, subcutâneas e superficiais, de acordo com o grau de envolvimento no tecido e o sítio de instalação do agente infeccioso no hospedeiro (TORTORA *et al.*, 2000). Dentre as micoses sistêmicas ou profundas de interesse veterinário têm-se a histoplasmose, blastomicose e a coccidioidomicose (SIDRIM & ROCHA, 2004). A feohifomicose têm sido reportada em gatos, manifestando-se mais freqüentemente em tecidos subcutâneos, sendo causadas por diversas espécies de fungos demáceos (MENDLEAU & HNILICA, 2003). Entretanto, nos casos de micoses subcutâneas e profundas, os dados de literatura são escassos e provavelmente não traduzem a real incidência destas infecções.

Dentre as infecções fúngicas, as micoses superficiais se destacam devido a freqüência de casos reportados em humanos e pequenos animais. As micoses superficiais podem ser classificadas em micoses superficiais estritas e dermatofitoses. As micoses superficiais estritas possuem a característica de acometerem a camada mais superficial do extrato córneo de humanos e animais, não induzindo nenhuma resposta inflamatória no hospedeiro (SIDRIM & ROCHA, 2004). Dentre as micoses superficiais, as malassezioses tem sido relatadas em animais domésticos causando dermatomicoses e otites (CRESPO *et al.*, 2000).

As dermatofitoses são micoses superficiais causadas por fungos denominados de dermatófitos. Esses seres pertencem ao grupo dos fungos filamentosos, hialinos, septados, queratofílicos, sensíveis à griseofulvina, capazes de colonizar e causar lesões no extrato córneo do homem e animais. As dermatofitoses são caracterizadas por lesões circulares discretas, com áreas de alopecia, bordos eritematosos e vesiculares, que circunscrevem uma parte central descamativa. Por serem ricas em queratina, as regiões da pele, pêlos e unhas são frequentemente acometidas por dermatófitos ((MENDLEAU & HNILICA, 2003; SIDRIM & ROCHA, 2004). Nos últimos anos, a literatura especializada vem divulgando um substancial aumento das micoses, sendo as dermatofitoses as principais infecções responsáveis por esse fenômeno.

2.2 Dermatofitos de importância veterinária

2.2.1 Dermatofitose: uma breve apresentação

A dermatofitose é uma micose superficial causada por microorganismos taxonomicamente relacionados e denominados de dermatofitos (KAC, 2000).

Os dermatofitos ocorrem com relativa frequência na clínica de pequenos animais, e a dermatofitose é a mais comum enfermidade causada por fungos em cães e gatos no hemisfério ocidental (ROCHETE *et al.*, 2003). Dados de incidência e prevalência variam em função do clima e dos reservatórios naturais, e autores relatam uma correlação positiva entre as dermatofitoses e a alta umidade (CABAÑES, 2000).

Animais de todas as idades, sexo ou raça são susceptíveis a infecções por dermatofitos, embora a doença ocorra mais comumente em animais jovens, velhos e imunodeprimidos (MORIELLO, 2004).

Vários autores citam que algumas dermatofitoses podem ser consideradas zoonoses (GARCIA & BLANCO, 2000; CRESPO *et al.*, 2000; TAKAHASHI, 2003). Devido aos aspectos de saúde pública, as dermatofitoses em cães e gatos merecem atenção especial, uma vez que estes animais mantêm estreito contato com humanos, especialmente crianças, normalmente susceptíveis à doença (COSTA *et al.*, 2002).

Os dermatofitos pertencem ao reino Fungi, filo Mycota. As dermatofitoses são causadas por três gêneros de fungos patogênicos: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (SIDRIM & ROCHA, 2004), cuja diferenciação é realizada de acordo com a forma dos macroconídios e dos microconídios (GRÄSER *et al.*, 1998). Entretanto, as espécies responsáveis pela ocorrência de dermatofitose em cães e gatos pertencem especialmente aos gêneros *Microsporum* e *Trichophyton* (MACIEL & VIANA, 2005).

De acordo com seu habitat natural os dermatofitos são classificados em geofílicos, zoofílicos e antropofílicos (SIDRIM & ROCHA, 2004). Os geofílicos habitam o solo, vivem como saprófitas e podem parasitar o hospedeiro desencadeando intensa reação inflamatória; os zoofílicos são dermatofitos adaptados à pele e pêlos de animais, e raramente são encontrados no solo; os antropofílicos são adaptados à pele e anexos de seres humanos, e não sobrevivem no solo (OLIVARES, 2003).

Embora haja inúmeras espécies de dermatófitos, a maioria dos casos clínicos em cães e gatos é causada por três delas: *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* (CABAÑES *et al.*, 1997; BRILHANTE *et al.*, 2003).

A infecção ocorre por contato direto com humanos, animais e solo contaminado (ZAITZ *et al.*, 1998). A exposição ao agente não garante a infecção devido a: remoção mecânica dos conídios, falta de sucesso na competição com a microbiota normal do animal, propriedades fungicidas dos ácidos graxos produzidos pelas glândulas sebáceas e resistência imunológica do hospedeiro (MORIELLO & DEBOER, 1991).

A estrutura física e química da pele representa a maior barreira de defesa do hospedeiro contra fungos patogênicos. A pele, em geral, é uma superfície inóspita para o crescimento fúngico em virtude da exposição dos raios UV, de constante renovação das células epiteliais, pela queratinização, bem como, pela competição da própria microbiota normal contra os demais microrganismos invasores (MORIELLO, 2004). Um dos fatores que poderia ser considerado favorável para os fungos dermatofíticos é que, estes, diferentes de outros fungos, se nutrem da queratina que é o principal constituinte do *stratum corneum* de homens e animais (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O animal é infectado quando, apesar dos mecanismos de defesa do hospedeiro, o agente penetra o extrato córneo ou o folículo piloso (MENDLEAU & RISTIC, 1992). A instalação do processo infeccioso primário clássico está relacionada ao fato de os dermatófitos produzirem enzimas queratolíticas e lipase, cuja ação favorece entrada e instalação da micose na pele e pêlos (CARLTON & MCGAVIN, 1998), e, em segundo plano, a forças mecânicas. VIANI *et al.*, (2001), em estudos da atividade enzimática em cepas de *M. canis*, analisaram queratinases, lipases, elastases e DNAses e demonstraram que a enzima queratinase está correlacionada diretamente com o desenvolvimento dos sintomas das lesões dermatofíticas, não sendo observada tal situação com as demais enzimas.

O dermatófito acomete o tecido queratinizado, penetra a pele, pêlos e unhas causando danos mecânicos que resultam em descamação da superfície epitelial e quebra do pêlo; seus metabólitos se difundem pelas células da epiderme causando reação inflamatória e de hipersensibilidade, responsáveis pelo desenvolvimento das lesões (DAHL, 1994).

A apresentação clínica da dermatofitose é muito variada, mas a lesão clássica descrita na literatura é caracterizada por alopecia circinada, irregular ou difusa e de

expansão centrífuga. As lesões acometem mais comumente a face, as orelhas, as patas e a cauda, podem evoluir para uma cura espontânea ou para lesão generalizada crônica que afeta todo o corpo do animal (MACIEL & VIANA, 2005). Em geral, o prurido é mínimo ou ausente, mas pode ser acentuado pela presença de ectoparasitas ou alergias.

Os dermatófitos desenvolvem-se crescendo do centro da lesão para as bordas, resultando, ao final de alguns dias, em lesões circulares discretas, com áreas de alopecia, bordos eritematosos e vesiculares, que circunscvem uma parte central descamativa. Possuem intensa descamação associada ou não à resposta inflamatória, resultante da atividade queratinolítica (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os pêlos quando parasitados por dermatófitos sempre são secundariamente à infecção da pele. Tal infecção é encontrada na região do folículo piloso, invadindo assim a camada córnea da epiderme, que se aprofunda em direção ao infundíbulo piloso. O dermatófito em contato com a queratina remove a cutícula e retoma o pêlo. Ao chegar nesse estágio da infecção pilosa, cada espécie fúngica expressa suas particularidades na dependência do hospedeiro. Foi sobre esses diversos aspectos parasitários que Sabouraud descreveu cinco tipos de parasitismos pilosos, citados a seguir: parasitismo endotrix, megaspórico ectotrix, micróide ectotrix, microspórico e fávico (SIDRIM & ROCHA, 2004).

A dermatofitose em cães e em gatos é uma doença folicular e os sinais clínicos são essencialmente um reflexo da foliculite do pêlo e posterior inflamação, sendo o prurido variável em intensidade, sendo muitas vezes indistinguível quando comparada com quadros de demodicose ou ainda com a piodermite bacteriana (MORIELLO, 2004).

Em cães, as lesões dermatofíticas podem consistir de combinações de pápulas, pústulas, com alopecia focal ou dispersa, apresentando zonas eritematosas, descamação e crostas. Reações de Kérion podem ser visualizadas geralmente na face, podendo muitas vezes mimetizar piodermite ou furunculoses (FOIL, 1998).

Nos gatos, as lesões são representadas com descamação e crostas com e sem alopecia. A alopecia pode ser focal, difusa ou ainda generalizada. A dermatofitose pode ainda provocar uma hiperpigmentação da pele dos felinos, sendo esta característica também encontrada em outras doenças de pele. Outros problemas decorrentes desta infecção seriam a constipação, em virtude da ingestão constante de pêlos, resultando em

anorexia, perda de peso e vômitos. Os gatos são ainda susceptíveis ao desenvolvimento de kérions, micetomas na pele e tecidos subcutâneos, apesar de tais apresentações serem consideradas raras (FOIL, 1998; SCOTT *et al.*, 2001, MORIELLO, 2004).

2.2.2 Diagnóstico clínico-laboratorial das dermatofitoses

O diagnóstico clínico e o tratamento das dermatofitoses nunca devem ser desligados dos devidos exames laboratoriais. Entretanto, o diagnóstico de tais infecções fúngicas é frequentemente realizado apenas clinicamente, sem o devido diagnóstico laboratorial; na Medicina Veterinária a situação se agrava, devido a falta de profissionais qualificados para a realização desses exames laboratoriais (HAY *et al.*, 1995; PIÉRARD *et al.*, 1996).

O diagnóstico feito com base apenas nos sinais clínicos pode ser falso, o que leva à superestimação da incidência das dermatofitoses. Além disso, a falta do diagnóstico laboratorial dificulta o conhecimento da população fúngica que é mais incidente em nossa região, visto que, relatos da literatura especializada demonstram que esta pode variar de acordo com o local (KOSRAVI & MAHMOUDI, 2003).

O diagnóstico definitivo baseia-se em uma série de etapas, observações e exames que vão desde o histórico clínico do animal, exame físico, exame com luz ultravioleta, coleta do material, microscopia direta do material, cultura fúngica e identificação final do agente patógeno (MENDLEAU & RISTIC, 1992).

A lâmpada de Wood é outro método diagnóstico para infecção dermatofítica, ela emite ondas de luz ultravioleta de comprimento de 330 a 365 nanômetros, e é utilizada no exame de pêlos ou tecidos suspeitos de dermatofitose, que podem fluorescer em presença direta dessa luz em local escuro. É indicado para selecionar pêlos para exame tricográfico, cultura fúngica e controle de tratamento (MORIELLO, 2004). A fluorescência da pele e do pêlo é resultado de um metabólito do triptofano produzido por alguns dermatófitos. Entre os dermatófitos zoofílicos somente o *M. canis* produz essa reação, que, segundo a literatura, ocorre em 50 a 70% dos casos (MACIEL & VIANA, 2005). Esse exame é útil na clínica de pequenos animais, entretanto apresenta limitações, baixa sensibilidade e algumas preparações tópicas, podem provocar uma fluorescência não-específica, originando resultados falso-positivos (ZRIMSEK *et al.*, 1999).

O diagnóstico inicial é feito através do exame direto de escamas de pele e pêlos, utilizando-se uma solução clarificante. O exame microscópico direto é um método rápido e fácil para detectar se o animal possui uma infecção fúngica. As amostras são examinadas ao microscópio óptico para verificar a presença de hifas e arthroconídios. Para visualizar as estruturas fúngicas, é necessário limpar e clarear a mostra com soluções alcalinas fortes, entre elas a mais comumente utilizada é o KOH na concentração de 10-30% (SIDRIM & ROCHA, 2004). Entretanto, muitas vezes a visualização das estruturas fúngicas no material analisado é difícil, sendo o resultado do exame não conclusivo devendo ser realizada a cultura do material.

O isolamento primário, ou seja, a distribuição do espécime clínico em meio de cultura artificial, é o passo que segue o exame direto. O isolamento primário pode ser feito em ágar Sabouraud, bem como no mesmo acrescido a antimicrobianos, tais como ao cloranfenicol e a cicloheximida. O cloranfenicol e a cicloheximida, quando associados ao ágar Sabouraud, inibem o crescimento de bactérias contaminantes e fungos saprófitas, respectivamente (SIDRIM & ROCHA, 2004). Outro meio, menos freqüentemente utilizado, mas que também pode ser usado na identificação de fungos dermatofíticos é o DTM (*Dermatophyte Test Medium*), conforme recomendado por GUILLOT *et al.*, 2001.

Após o isolamento primário, segue a caracterização da macro e micromorfologia da colônia fúngica. Estes achados devem ser considerados sempre em conjunto, visto que a colônia fúngica pode sugerir a espécie fúngica em questão, mas são os achados micromorfológicos que irão garantir a caracterização e o diagnóstico preciso. O estudo micromorfológico é feito a partir do isolamento primário, sendo uma pequena alíquota da colônia retirada do ágar e montada entre lâmina e lamínula com corante lactofenol azul-algodão. A montagem é observada em microscopia óptica em objetiva de 40X. Nestas preparações, podem ser visualizadas estruturas de reprodução, bem como estruturas de ornamentação. Apesar das observações micromorfológicas serem de extrema relevância, muitas vezes, o micologista ainda lança mão das características nutricionais do fungo, que em muitas ocasiões são de extrema valia no diagnóstico final desses microrganismos (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Os dermatófitos isolados de cães e gatos crescem, geralmente, em cerca de sete dias, à temperatura de 25-28° C. Após o isolamento da cepa, é necessário identificar o gênero e a espécie infectante por meio da visualização dos conídios e do micélio

(OLIVARES, 2003). Em cultura os dermatófitos produzem hifas septadas que se ramificam e formam o micélio que possui estruturas de reprodução assexuada, os macroconídios e os microconídios. Esses conídios diferem entre as espécies de dermatófitos quanto à forma, ao tamanho, ao número e à disposição dos mesmos ao longo da hifa (SIDRIM & ROCHA, 2004).

O *M. canis* cresce bem em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida, incubado à temperatura ambiente ou a 37°C, produzindo, em uma semana, colônia cotonosa branca ou amarelada, com reverso amarelo alaranjado (Figura 1). Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios em formato fusiforme, com parede celular espessa e eqüinulada, apresentando de 6 a 15 células e apêndice de fixação (Figura 2) (LACAZ *et al.*, 1998).

A observação da lâmina em lactofenol azul-algodão mostra hifas septadas e macroconídios numerosos, fusiformes, verrucosos, com uma protuberância apical assimétrica, alongados, de aspecto rugoso e com parede grossa que, usualmente, contém de cinco a sete septos, podendo ser observados até quinze. As paredes que separam os septos são delgadas. Uma pequena quantidade de microconídios, se presentes, em formato de clava ou piriforme, de paredes delgadas também podem ser encontrados bem como clamidoconídios, órgãos nodulares e hifas pectinadas (OLIVARES, 2003; SUTTON *et al.*, 1998).



Figura 01: Verso da colônia de *M. canis* em ágar batata.

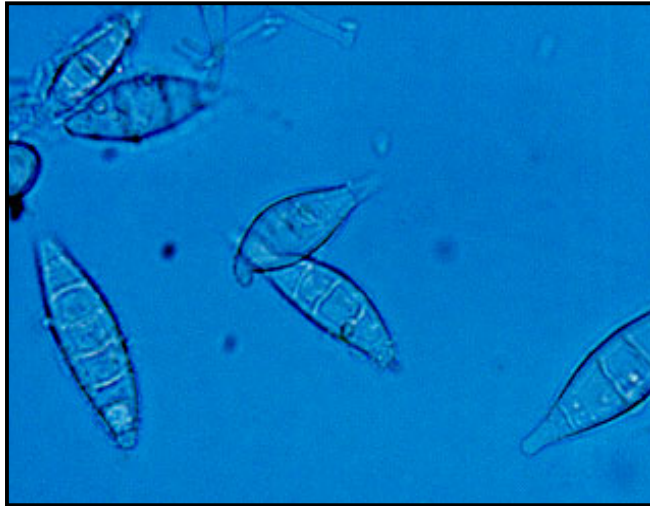


Figura 02: Foto de microcultivo de *M. canis* com numerosos macroconídios.

O *T. mentagrophytes* apresenta uma textura furfurácea ou pulverulenta em ágar Sabouraud, sem relevo acentuado, formando às vezes círculos concêntricos, de coloração variando de branco-amarelado a castanho-avermelhado (Figura 3). O reverso geralmente apresenta pigmento castanho podendo tender para o vinho. As características de diferenciação nem sempre são evidentes e todas as espécies apresentam elevada tendência ao pleomorfismo (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Apresenta um crescimento rápido com maturação por volta de seis a onze dias da sementeira primária. Microscopicamente, nota-se uma exuberância de estruturas de frutificação, sendo observada geralmente grande quantidade de microconídios arredondados e agrupados, o que lhe confere aspecto de cacho. Quando presentes, os macroconídios mostram o aspecto semelhante a um charuto, com um a seis septos transversais ligados a hifas hialinas e septadas (Figura 4). Observa-se, com muita frequência, grande quantidade de hifas em espiral, órgãos nodulares, hifas em raquete e clamidoconídios intercalares (SIDRIM & ROCHA, 2004).



Figura 03: Detalhe do verso da colônia de *T. mentagrophytes*.



Figura 04: Micromorfologia de *T. mentagrophytes*

O *M. gypseum* cresce bem em ágar Sabouraud com cloranfenicol e cicloheximida, incubado à temperatura ambiente ou a 37°C, produzindo, em uma semana, colônia plana de bordos irregulares e pulverulenta. O verso da colônia apresenta coloração amarelada- acastanhada (Figura 5). Microscopicamente, apresenta numerosos macroconídios simétricos, com parede celular fina, e septos (Figura 6) (LACAZ *et al.*, 1998).

A observação da lâmina em lactofenol azul-algodão além das hifas septadas e macroconídios numerosos, algumas cepas mostram numerosos microconídios piriformes. A fluorescência à lâmpada de Wood não é observada para essa espécie de dermatófito (OLIVARES, 2003).

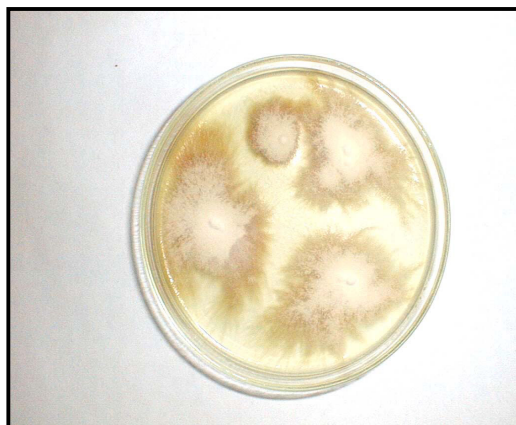


Figura 05: Detalhe do verso da colônia de *M. gypseum*.

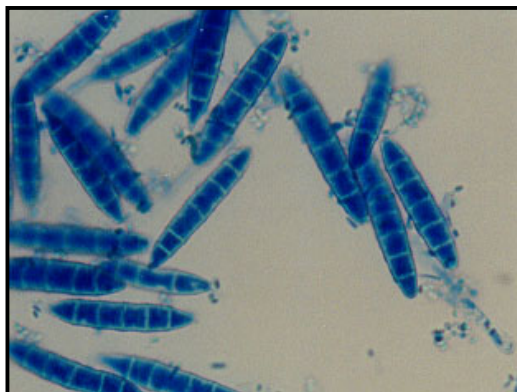


Figura 06: Micromorfologia de *M. gypseum*

2.2.3 Aspectos epidemiológicos das dermatofitoses

A incidência de dermatofitose varia de acordo com o clima e com o reservatório natural. Entretanto, em condições geográficas similares espécies de dermatófitos podem se apresentar diferentemente em animais e humanos (PIER *et al.*, 1994). De acordo com a literatura, os animais podem ser considerados como reservatório de dermatófitos zoofílicos, sendo a sua incidência variável de acordo com o clima e com o habitat do reservatório (CABAÑES, 2000).

Ao longo dos anos, inúmeros estudos sobre a incidência e etiologia das dermatofitoses em animais vêm sendo descritos em todo mundo, podendo variar de 7% a 40% em cães e de 9% a 46 % em gatos (CABAÑES *et al.*, 1997; BRILHANTE *et al.*, 2003).

Devido à frequência com que ocorrem dermatofitoses em centros urbanos, é importante salientar o papel de disseminadores dos pequenos animais domésticos (PINHEIRO *et al.*, 1997). Isso se deve aos dermatófitos zoofílicos serem adaptados à pele de cães e gatos, tornando esses animais possíveis carreadores assintomáticos de conídios fúngicos em sua pele e pêlos (MENDLEAU & RISTIC, 1992; KANO *et al.*, 1998).

Os animais portadores assintomáticos de fungos dermatofíticos, quando mantidos em ambientes livres de estruturas fúngicas, podem manter-se com exames micológicos negativos, provando assim que o animal nada mais é do que um reflexo do seu ambiente ou de suas condições de manejo (MORIELLO & DEBOER, 1991; SPARKES *et al.*, 1994).

Dentre os animais domésticos os gatos podem ser considerados reservatórios assintomáticos de *M. canis*, por isso esses animais são considerados importantes agentes no ciclo epidemiológico do patógeno, independente do sexo e tamanho dos pêlos (PIER & MORIELLO, 1998). Vários autores relatam a importância dos animais assintomáticos, pois estes são portadores silenciosos de fungos dermatofíticos, o que dificulta o rompimento do ciclo epidemiológico da doença (SYMPANYA & BAXTER, 1996; CABAÑES, 2000).

A dermatofitose é uma infecção que acomete principalmente animais jovens, em animais adultos frequentemente está associada à imunossupressão sistêmica. Inúmeros relatos indicam que cães e gatos de menos de um ano de idade são os mais sensíveis.

Este fato pode ser justificado pela falta de maturidade imunológica, pela baixa produção de ácidos graxos de cadeia saturada, dentre outros fatores (CABAÑES, 2000; SILVA *et al.*, 2003; BRILHANTE *et al.*, 2003).

Diversos estudos citam que animais de pêlos longos são mais predispostos às dermatofitoses. Isso pode estar relacionado a fatores hereditários ou por que os pêlos longos alojam conídios mais facilmente, criando um ambiente favorável ao fungo, protegendo do sol (MORIELLO, 2004). Entre os gatos os animais da raça persa são os mais predispostos (MENDLEAU & RISTIC, 1992; BRILHANTE *et al.*, 2003). Relatos de literatura indicam que nos cães, observa-se maior incidência da doença em animais da raça Yorkshire terrier (CABAÑES, 2000; BRILHANTE *et al.*, 2003). As razões para a predisposição de tais raças, ainda, não são bem claras. Possivelmente os pelos alongados facilitam as condições ótimas de temperatura e umidade para que as estruturas fúngicas fiquem protegidas contra a dessecação, favorecendo assim a sua propagação (SPARKES *et al.*, 1994). Entretanto, esta hipótese contradiz com trabalho em dermatofitose humana, onde discutem que os pêlos mais curtos, em casos de *Tinea capitis*, beneficiariam a implantação e instalação de arthroconídios (KANWAR & BELHAJ, 1987).

Ainda que seja controverso o papel exato do animal nas infecções humanas causadas por fungos zoofílicos, de fato, a ausência de um reservatório pode inviabilizar a capacidade de infecção do fungo zoofílico, visto que cepas de *M. canis* podem perder a virulência após quatro passagens de transmissão homem a homem, sendo necessário que o microrganismo retorne ao animal, para que se mantenha a virulência da cepa (RIPPON, 1988).

O *M. canis*, dentre os dermatófitos, é o responsável pela maioria de casos de micoses em animais de estimação e o mais freqüente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas (SYMPANYA & BAXTER, 1996; CABAÑES, 2000; BRILHANTE *et al.*, 2003). É um fungo filamentosos, dermatófito zoofílico, cosmopolita transmitido por diversos animais domésticos, tendo como principal reservatório felinos jovens, que podem apresentar-se clinicamente afetados e, em contraste, os adultos portadores podem não apresentar lesões (SIDRIM & ROCHA, 2004; LACAZ *et al.*, 1998).

Dados semelhantes foram encontrados nas região sudeste e nordeste do Brasil, onde o *Microsporum canis* é o fungo dermatofítico mais comumente isolado em

espécimes clínicos de cães e gatos, seguido de *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* (GAMBALE *et al.*, 1987; BRILHANTE *et al.*, 2003).

As infecções por *T. mentagrophytes* ocorrem regularmente em cães e ocasionalmente em gatos. Já as infecções por *M. gypseum* ocorrem ocasionalmente em cães e raramente em gatos, já que os cães possuem o hábito de cavar o solo tornando-se mais expostos ao dermatófito geofílico (CARLOTTI & BESINGNOR, 1999).

É indiscutível a importância de estudos epidemiológicos, visto que, eles relatam a real incidência das espécies isoladas em nosso meio, bem como apontam o aparecimento de novas espécies que antes não eram isoladas na região.

Entretanto para que seja realizado um estudo satisfatório da microbiota fúngica à longo prazo, é necessário que se escolha um método de estocagem das cepas isoladas adequado, haja visto, que elas serão usadas como subsídios na observação da ocorrência de alterações fenotípicas e genotípicas desses microrganismos (KNASMMÜLLER *et al.*, 1997; MILLANTA *et al.*, 2000).

2.3. Estocagem de microorganismos

2.3.1 Estocagem de fungos: Abordagem geral

Muitos protocolos vem sendo sugeridos para preservação de cepas fúngicas, entretanto nenhuma delas se aplica a todas as espécies fúngicas (ESPINEL-INGROFF *et al.*, 2004). O estoque de fungos isolados de processos infecciosos apresenta grande importância, pois muitas vezes esses agentes apresentam crescimento lento e escasso, acarretando em um difícil isolamento das cepas (DOAN & DAVIDSON, 2000).

Das diversas metodologias de estocagem fúngica utilizadas por centros de pesquisa em todo o mundo, algumas têm maior destaque por motivos variados, como a praticidade ou resultados satisfatórios para determinadas espécies. A escolha de um método mais adequado deve considerar parâmetros, como: o objetivo do estoque e da coleção; a manutenção das estabilidades genética, fisiológica e morfológica. Assim, a literatura referencia estocagem em nitrogênio líquido, em água destilada estéril, congelação em temperaturas variadas (- 20, - 70 e - 196 °C) e a liofilização, todos com uso ou não de crioprotetores nas mais diversas concentrações e tipos.

A criopreservação é a técnica preferida em muitos bancos de microorganismos, pois as culturas mantêm a estabilidade por longos períodos devido a diminuição da atividade metabólica que ocorre nesta temperatura (SMITH & RYAN, 2003).

Todos os organismos vivos possuem habilidade de responder às modificações de temperatura ambiental e de enfrentar as novas condições térmicas (GROB, 1999). Em resposta a um decréscimo súbito da temperatura, os organismos conseguem promover algumas alterações fisiológicas e bioquímicas, geralmente descritas como resposta ao choque térmico ou ao resfriamento (GRAUMANN & MARAHIEL, 1996; THIERINGER *et al.*, 1998). Além disso, os organismos submetidos ao processo de congelamento sintetizam proteínas específicas chamadas de proteínas transicionais de choque térmico ou proteínas da aclimação ao frio (PANOFF *et al.*, 1998). Esta resposta abrange diferentes processos celulares incluindo a aquisição de uma criotolerância.

Diferentes tipos de pré-tratamentos físicos ou químicos podem gerar criotolerância (PANOFF *et al.*, 1995; THAMMAVONGS *et al.*, 1996). O pré-tratamento de células pela exposição a um stress leve induz a uma maior resistência na exposição a um estresse severo, fenômeno conhecido como tolerância, adaptação fenotípica ou habituação (THAMMAVONGS *et al.*, 2000).

Entre os problemas que envolvem o congelamento de cepas fúngicas estão o aumento da concentração de eletrólitos e de radicais livres, mudanças no pH, desnaturação de proteínas e desidratação celular. Além desses problemas, a ocorrência de formação de cristais, no espaço intracelular, é um efeito extremamente danoso para célula (MAZUR, 1984). Ciclos repetidos de congelamento e descongelamento são comumente usados para ressaltar a taxa de mortalidade relacionada à congelamento (HUBÁLEK, 1996).

A formação de gelo no meio intracelular causa ruptura do sistema de membranas celulares, resultando em perda da semi-permeabilidade e da compartimentação celular; levando à morte celular (SHAW *et al.*, 2000). A injúria mecânica sofrida pelas células advém de dois fenômenos: o comportamento peculiar da água, que se expande ao congelar-se, e a conformação dos cristais de gelo. Entretanto, evitar a formação desses cristais não é uma tarefa fácil, já que grande parte das células é composta de água.

A excessiva formação de cristais de gelo intracelular irá ocorrer caso estas células sejam congeladas no estado hidratado. Portanto, a água precisa ser removida antes do congelamento, para evitar a injúria causada pelos cristais de gelo (SANTOS, 2001). Entretanto, a água tem muitas funções biológicas fundamentais nas células de

organismos vivos: é um importante solvente, meio de transporte, resfriador (através da evaporação), e um constituinte essencial e estabilizador da estrutura das macromoléculas e organelas, cuja conformação funcional se mantém, principalmente, devido às interações hidrofílicas e hidrofóbicas entre elas (KRAMER & BOYER, 1995; VERTUCCI & FARRANT, 1995). Desde modo, o sucesso de um protocolo de criopreservação depende da desidratação para um teor de umidade que seja baixo o suficiente para evitar a formação de gelo intracelular, mas não tão reduzido que cause injúria por desidratação.

A desidratação pode ser obtida por evaporação da água ou por tratamento com soluções concentradas de crioprotetores químicos. Entre os crioprotetores mais comumente utilizados estão o Dimetilsulfóxido (DMSO), etilenoglicol, metanol, propilenoglicol e o glicerol (SAKAI, 1995; BRILHANTE *et al.*, 2004). Destes, o glicerol parece ser o menos eficiente, pois, apesar de ser menos tóxico que os outros crioprotetores citados, ele possui um lento poder de penetração aumentando, assim, o estresse osmótico (SAMUEL KIM *et al.*, 2001).

A estocagem de cepas em ágar batata a -20°C ou -70°C pode ser feita com ou sem adição de crioprotetores. Apesar das dificuldades encontradas ao se realizar o congelamento de cepas fúngicas, observa-se uma certa taxa de sobrevivência em microrganismos congelados sem a adição de um protetor (BRILHANTE *et al.*, 2004). Entretanto, é descrito que a presença de um agente crioprotetor adequado aumenta a sobrevivência da célula consideravelmente (HUBÁLEK, 2003).

A descoberta que o glicerol protegia células eucarióticas contra os danos da congelação (LOVELOCK & BISHOP, 1959; POLGE *et al.*, 1949) marcou o início da criotecnologia moderna. Entretanto, os crioprotetores podem ser tóxicos ou podem causar estresse osmótico, levando à morte as células ou modificando suas características fenotípicas em cultura (SAKAI, 1995).

A eficiência de um crioprotetor depende de ele possuir: uma alta solubilidade em água diminuindo assim o ponto de congelamento; uma alta permeabilidade para minimizar o gradiente osmótico; e uma baixa toxicidade (BIDAULT *et al.*, 2000).

Sabe-se que, baixas temperaturas têm efeitos severos nas propriedades bioquímicas e fisiológicas de várias células, como diminuição na eficiência da produção de proteínas, baixa fluidez da membrana celular, estabilização da dupla hélice ou da estrutura secundária da molécula de DNA ou RNA, lento arranjo estrutural das proteínas e decréscimo da atividade enzimática (GRAUMMANN *et al.*, 1996; PANOFF

et al., 1998). A maioria dos organismos deve ter desenvolvido mecanismos de adaptação para driblar este fenômeno. Os mecanismos fundamentais de baixa expressão de genes temperatura-dependentes e respostas a baixas temperaturas têm sido estudados em alguns organismos (THIERINGER *et al.*, 1998; PHADTARE *et al.*, 1999; BROWSE & XIN, 2001).

Uma ampla quantidade de fatores pode afetar a efetividade da criopreservação em microrganismos, por exemplo, espécie fúngica envolvida, cepa, tamanho e formato celular, fase e taxa de crescimento, temperatura de incubação, composição do meio de crescimento, pH, osmolaridade e aeração, quantidade de água intracelular, quantidade de lipídios e composição celular, densidade ao congelamento, composição do meio de congelamento, taxa de congelamento, temperatura e duração do estoque, taxa de descongelamento e meio de recuperação (DAY, 1995; HUBÁLEK, 1996; KIRSOP & DOYLE, 1991).

Mais recentemente, têm sido utilizados açúcares (sacarose, trealose e glicose) como substâncias crioprotetoras porque eles não apresentam citotoxicidade mesmo quando se acumulam em grande quantidade no citoplasma. Em comparação com os crioprotetores tradicionais, esses açúcares mostram alta eficiência na estabilização das membranas celulares durante o congelamento. Pode ser observada evidência do efeito protetor desses compostos em plantas de clima temperado. Essas plantas acumulam carboidratos solúveis em seus tecidos durante a aclimação ao frio, na natureza ou sob condições experimentais. O período em que tais plantas são mais tolerantes ao congelamento corresponde ao ponto de máximo acúmulo desses compostos (IMANISHI *et al.*, 1998; SAKAI & YOSHIDA, 1968). De modo semelhante, grande quantidade de açúcares como sacarose, trealose e oligossacarídeos (rafinose e estaquiiose) acumulam-se em estruturas que são tolerantes a intensa desidratação. Este é o caso de esporos de fungos, leveduras, musgos e samambaias (CROWE *et al.*, 1988; HOEKSTRA *et al.*, 1994; OLIVER, 1996).

O modo de ação dos açúcares na aquisição da tolerância à desidratação e ao congelamento ainda não é totalmente conhecido e uma correlação direta de causa e efeito ainda não foi demonstrada, mas ele possivelmente envolve múltiplos componentes. A princípio, se propôs que os açúcares agiam como agentes osmóticos externos, removendo o excesso de água intracelular através de um gradiente osmótico (DUMET *et al.*, 1993). Outras evidências levaram à formulação de duas hipóteses diferentes sobre o modo de ação destes compostos. Primeiro, sugere-se que eles sejam

excelentes agentes vitrificadores e, por conseguinte, seu efeito protetor é atribuído à vitrificação das membranas celulares e das biomoléculas (HIRSH, 1987). Outra hipótese, denominada hipótese da substituição da água (water replacement hypothesis) propõe que estes açúcares podem substituir a água removida das biomoléculas, desta forma mantendo as estruturas hidrofílicas na sua orientação hidratada e evitando perda de funcionalidade, mesmo depois de a água ter sido removida (CROWE *et al.*, 1988).

A adição de açúcares (sacarose, glicose, frutose, sorbitol, trealose ou rafinose) a uma solução de vitrificação influencia nas propriedades gerais da solução, devendo, então, as propriedades do açúcar ser levadas em consideração no estabelecimento e modificação de soluções de criopreservação (LIEBERMANN *et al.*, 2002; KULESHOVA *et al.*, 1999). Aditivos com alto peso molecular como a trehalose não penetram na membrana celular, mas podem reduzir significativamente a quantidade de crioprotetor necessária, bem como, a toxicidade do mesmo pela sua diminuição. Ainda, demonstrou-se que o acúmulo intracelular de compostos endógenos específicos, como os carboidratos, pode aumentar a tolerância dos fungos sobre condições de estresse ambiental (BROWN, 1978).

Experimentos com *Saccharomyces cerevisiae* mostraram que o acúmulo de trealose no interior destes microorganismos aumentava a viabilidade das suas células à exposição a um sistema de geração de radicais livres (H₂O₂/ferro). Também, cepas mutantes incapazes de sintetizar a trealose eram bem mais sensíveis à morte pela oxidação e quando se fazia o provimento desse carboidrato à estas cepas, a sua resistência aumentava consideravelmente (BERNAROUJ *et al.* 2001)

Outro método de estoque frequentemente utilizado em Micologia é a manutenção de cepas em água destilada e solução salina. Esse é um método extremamente fácil e barato para a preservação de diversas espécies fúngicas (TADDEI *et al.*, 1999). Muitas vezes, adiciona-se camadas de óleo mineral para evitar a evaporação da água destilada ou da solução salina. Esta é uma técnica bastante utilizado e que não necessita de estrutura especial para sua realização (DESHMUKH, 2004), sendo efetivo para uma grande variedade de fungos, como cepas de *Aspergillus niger*, *Fusarium* sp, *Microsporium canis*, entre outros (BUENO & GALLARDO, 1998; BRILHANTE *et al.*, 2004).

Apesar das facilidades da realização dessa técnica, conhecida como método Castellani, o crescimento fúngico ocorre lentamente podendo levar a mudanças morfofisiológicas, bem como, à deteriorização das cepas. Diante disso, estudos relatam

que a escolha do momento ideal em relação à atividade de esporulação, devem ser considerados afim de que se mantenha a viabilidade do estoque (QIANGQIANG & JIAJUN, 1998).

Em 1998, Bueno & Gallardo utilizaram fungos filamentosos não-dermatofíticos e os estocaram em água destilada estéril a 4 °C por dois anos. Após a estocagem, a taxa de sobrevivência foi de 100 % para todas as espécies e cepas utilizadas. Estes dados não expiram total confiança, tendo em vista, mostrar-se uma exceção, quando comparados a relatos de outros autores, que descrevem taxas variando de 87 a 98 %, variando em função do tempo, espécie e temperatura (Mc GINNIS *et al.*, 1974; PASARELL & Mc GINNIS, 1992; RODRIGUEZ *et al.*, 1992). Apesar dos dados satisfatórios apresentados, a técnica ainda mostra algumas dificuldades como descrito por CROAN *et al.* (1999), que encontraram problemas quando utilizaram isolados fúngicos tropicais e os estocaram em água destilada estéril, variando de 4 a 16 °C.

A conservação de cepas em nitrogênio líquido a -196°C ou em vapor de nitrogênio líquido a -150°C, é considerada uma metodologia de estocagem das mais eficientes. Nesse tipo de estocagem, as cepas não tem prazo de viabilidade, podendo se manter livres de contaminação, sem apresentar mudanças nas propriedades vitais, biológicas e genéticas. Entretanto esta metodologia é considerada incompatível com a realidade de muitos laboratórios. Isso ocorre, devido à necessidade de suprimentos contínuos de nitrogênio, além de precisar de uma infra-estrutura adequada para manutenção desse método (LARA-HERRERA *et al.*, 1998).

A liofilização nada mais é que uma secagem ou desidratação celular. É bastante utilizada em metodologias científicas que visam manter a atividade celular intacta por meio de diminuição do seu metabolismo, ou seja, induzir dormência ao máximo possível. Apresenta vantagens, como: facilidade de estoque em pequenos espaços, não requer mão-de-obra de manutenção nem cuidados especiais (CROAN, 2000). É um método ideal para estocagem de diversas cepas, evitando assim a mutação dos cultivos (BUNSE & STEIGLEDER, 1991). Esse estoque descarta o perigo de bactérias e fungos contaminantes, sendo facilmente mantidos e transportados, com a preservação das características morfológicas e bioquímicas das cepas, sem apresentar pleomorfismo no momento do recultivo (SHARMA & SMITH., 1999).

A principal desvantagem da liofilização é que, neste tipo de tratamento, as células podem sofrer danos irreversíveis, em virtude da retirada de água e do calor excessivo, que não podem sobrepor o limite celular (DAEMEN & VAN DER STEGE,

1982; RYAN *et al.*, 2001; HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004). Desta forma, mesmo sendo uma metodologia bastante empregada e conhecida já há bastante tempo, ainda percebem-se variações surpreendentes no tocante aos resultados obtidos. Prova disso são estudos que ao experimentarem a liofilização nos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria brongniartii*, perceberam que, em matriz de leite desnatado e polivinilpirrolidona, o método foi muito promissor para a segunda espécie, ao passo que resultou em viabilidade zero para a segunda (HORACZEK & VIERNSTEIN, 2004).

Sabe-se também, que algumas cepas apresentam relativas dificuldades para a manutenção da sua viabilidade. Esta dificuldade está relacionada à produção de poucos microconídios pelas cepas. Assim, cepas de *Epidermophyton floccosum*, que são totalmente desprovidas de microconídios, possuem uma menor chance de se manterem viáveis com a liofilização. Em se tratando de espécies do gênero *Microsporum* sp que produzem uma pouca quantidade de microconídios, após o isolamento destas culturas, devem ser utilizados meios que sejam favoráveis à produção de microconídios antes de se tentar o congelamento dessas cepas (BUNSE & STEIGLEDER, 1991).

Assim, vêm sendo feita o uso de meios ricos em nutrientes que estimulem o crescimento e a esporulação de cepas fúngicas a fim de garantir a eficiência da liofilização (CLIQUET & JACKSON, 1999). E, uma vez realizada a liofilização, esta vem sendo descrita como uma metodologia ideal para garantir uma boa preservação de cepas de dermatófitos estocadas por longos períodos (DESHMUKH, 2003).

Todas as técnicas relacionadas aqui possuem vantagens e desvantagens, e nenhuma delas tem sido correlacionada pela literatura especializada como uma forma definitiva para garantir 100% de viabilidade das cepas após o período de estocagem. Novas técnicas de estocagem visam adequar o melhor método de preservação para cada fungo, possibilitando metodologias espécie-específicas, e, vislumbrando a preservação de cepas a longo prazo, seja em temperatura ambiente ou em freezer. Objetivam, ainda, que estas cepas não percam o seu padrão genético, morfológico, bioquímico ou fisiológico, como alterações nos componentes da parede celular e perda de virulência. Atualmente, boa parte dos bancos de coleções faz uso de pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a viabilidade e manutenção das cepas (SILVA *et al.*, 1994; BRILHANTE *et al.*, 2004; GIRÃO *et al.*, 2004).

3. JUSTIFICATIVA

É evidente o papel da manutenção de cepas de dermatófitos, *in vitro*, haja vista sua importância para investigações laboratoriais, no tocante a padronização das características fenotípicas e genotípicas desses microrganismos. Neste contexto, duas abordagens são necessárias. Em primeiro lugar, é de extrema valia que sejam realizados estudos referentes aos aspectos epidemiológicos e micológicos das dermatofitoses; bem como que sejam realizados estudos referentes à análise da viabilidade e preservação de cepas de dermatófitos *in vitro*, através da aplicação de técnicas de estocagem espécie-específicas.

4. HIPÓTESE

Dentre os dermatófitos envolvidos em quadros de dermatofitose canina e felina, o *Microsporum canis* continua sendo o mais prevalente, e quando estocado em meios inapropriados, a exemplo de outros dermatófitos, apresenta uma baixa viabilidade biológica, devendo portanto, haver um método mais adequado para sua preservação.

5.OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Esta investigação teve como objetivo principal realizar um estudo sobre as dermatofitoses canina e felina, enfocando os aspectos epidemiológicos, micológicos e manutenção de cepas dermatofíticas *in vitro*.

5.2 Objetivos Específicos

1. Realizar um levantamento epidemiológico das dermatofitoses em cães e gatos, através da coleta de espécimes clínicos oriundos de animais com lesões cutâneas;
2. Caracterizar fenotipicamente as cepas isoladas no levantamento epidemiológico;
3. Analisar a viabilidade de cepas de *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, isolados de espécimes clínicos de cães e gatos, estocadas em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas a 25° C.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Estudo Epidemiológico

6.1.1 Colheita do material clínico

Foram cadastradas clínicas veterinárias, localizadas na Região Metropolitana de Fortaleza, para o fornecimento do espécime clínico. As amostras analisadas consistiram de espécimes clínicos oriundos de cães e gatos, portadores de lesões clínicas sugestivas de dermatomicoses. Após o preenchimento de um questionário com dados clínicos referentes ao animal, a colheita teve início com a realização da antissepsia local com álcool a 70%. O material clínico foi colhido e acondicionado em frascos estéreis; os pêlos tonsurados (quebrados) ou macroscopicamente anormais foram retirados com o auxílio de uma pinça estéril, e cada uma das amostras foi processada individualmente. O espécime era devidamente identificado e remetido ao Centro Especializado em Micologia Médica.

6.1.2 Identificação laboratorial

O processamento laboratorial consistiu de exame do espécime clínico por microscopia direta e cultura do material coletado em ágar Sabouraud, ágar Sabouraud com cloranfenicol, e agar Sabouraud com cicloheximida. A identificação laboratorial baseou-se na diferenciação macroscópica e microscópica das colônias e identificação final, por meio de provas bioquímicas adequadas para as cepas de dermatófitos isoladas.

Para análise do exame direto, utilizou-se hidróxido de potássio (KOH) em concentração de 30%, sendo sua interpretação feita a partir da ausência ou presença de elementos fúngicos. Em caso de parasitismos, em pele e unha, por dermatófitos, a presença de hifas artroconidiadas fundamentava o diagnóstico. Em relação ao pêlo, o parasitismo foi descrito a partir do tamanho do artroconídio e se estava por dentro ou por fora do pêlo.

Quanto à cultura fúngica, esta foi preparada simultaneamente ao exame direto, em que alíquotas de pêlos e escamas de pele foram semeadas nos meios de cultura.

Depois de semeados, os tubos foram incubados, entre 25°C e 30°C, durante 10 dias. No momento em que as macrocolônias foram detectadas, seguiu-se para a análise das características macromorfológicas, sendo levados em consideração o relevo e a textura, bem como a presença ou ausência de pigmento.

Durante a presente análise, a macromorfologia de *M. canis* foi analisada em ágar Sabouraud dextrose e em ágar batata dextrose, após 10 dias de incubação. A textura e o relevo das colônias foram relatados conforme SIDRIM & ROCHA, 2004, bem como a presença e ausência de pigmento foram descritas.

A prova de requerimentos vitamínicos foi realizada no intuito de descrever as exigências nutricionais das diversas cepas de *M. canis*, para posterior comparação destas com a literatura. Os meios de cultura utilizados foram enriquecidos com ácido nicotínico, tiamina, histidina e inositol, sendo a base do ágar T1 ao T5 a caseína e do ágar T6 e T7 o nitrato de amônia. Tais meios serão detalhados a seguir: T1 (ágar base caseína), T2 (ágar base caseína com inositol), T3 (ágar base caseína com tiamina e histidina), T4 (ágar base caseína com tiamina), T5 (ágar base caseína com ácido nicotínico), T6 (ágar base nitrato de amônia) e T7 (ágar base nitrato de amônia com histidina). Além da realização da prova da perfuração de pêlo *in vitro* e teste da urease, conforme recomendado por SIDRIM & ROCHA, 2004.

6.2 Avaliação da estocagem

Na análise retrospectiva, para avaliação da estocagem de cepas de dermatófitos de origem animal, mantidas na Micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica – CEMM, foram analisados os estoques de 172 cepas de dermatófitos isolados de cães e gatos, sendo: 142 cepas de *Microsporium canis*, 10 cepas de *Microsporium gypseum*, 16 cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e 4 cepas de *Trichophyton tonsurans*. As cepas foram estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses) na micoteca do CEMM, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Dentre as 172 cepas de dermatófitos estocadas na micoteca do CEMM, 57 se encontravam em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, 24

em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, 15 em ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e 76 cepas de dermatófitos estavam mantidas em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C).

As cepas, de cada um de seus diferentes estoques, tiveram um fragmento da colônia repicado para tubos contendo 2ml de BHI em caldo e incubados em temperatura ambiente (25° C). Os tubos foram observados diariamente por um período de até 10 dias, a fim de verificar o crescimento do micélio. Após esse período as cepas foram transferidas para tubos contendo ágar batata onde foi confirmada a viabilidade das cepas.

Características fisiológicas das cepas de *M. canis* viáveis foram avaliadas através de provas de requerimentos nutricionais (tiamina, ácido nicotínico, inositol, histidina), perfuração de pêlo *in vitro* e teste da urease, conforme recomendado por SIDRIM & ROCHA, 2004.

7. RESULTADOS

7.1 Levantamento epidemiológico

Este estudo incluiu 28 gatos e 174 cães com lesões clínicas sugestivas de dermatofitose. Trinta e um animais (15,35%) foram positivos para dermatófitos. Estes fungos foram isolados de 22 dos 174 (12,64%) espécimes clínicos oriundos de cães e de 9 dos 28 (32,14%) espécimes clínicos oriundos de gatos (tabela 1).

Tabela 1. Prevalência de dermatofitose em cães e gatos na cidade de Fortaleza – CE, no período de Março/2005 a Fevereiro/2006.

Diagnóstico	Cães (n)	Gatos (n)	Total de animais
Animais com suspeita de dematofitose	174	28	202
Animais com dematofitose	22 (12,64%)	9 (32,14%)	31 (15,35%)

Dos 174 cães estudados, 64 tinham menos que 1 ano de idade e destes, 10 (15,63%) foram positivos para dermatófitos. 108 cães apresentavam mais que 1 ano de idade, dos quais 12 (11,11%) foram positivos para dermatófitos. Dois cães não tiveram a idade relatada (tabela 2).

Dos 28 gatos, 16 tinham menos que 1 ano de idade, e destes 7 (43,75%) foram positivos para dermatófitos. Doze gatos tinham mais que 1 ano de idade, e destes somente 2 (16,67%) foram positivos para dermatófitos (tabela 2).

Tabela 2. Prevalência de dermatofitose em cães e gatos relacionada à idade dos animais

Diagnóstico	Cães				Gatos			
	≤ 1 ano		> 1 ano		≤ 1 ano		> 1 ano	
	n	%	n	%	n	%	n	%
animais sem dermatofitoses	54	84,375	96	88,89	9	56,25	10	83,33
animais com dermatofitoses	10	15,625	12	11,11	7	43,75	2	16,67
Total	64	100,0	108	100,0	16	100,0	12	100,0

* dois cães não tiveram idade relatada

As culturas foram positivas para duas espécies de dermatófitos. A distribuição numérica dessas espécies fúngicas nos cães foi de *M. canis* (96,77%) e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (3,23%). Por outro lado, todos os gatos com dermatofitose foram infectados por *M. canis* (100.0%) (tabela 3).

Tabela 3. Espécies de dermatófitos isolados de cães e gatos com lesões sugestivas de dermatofitose

Dermatófitos	Cães		Gatos	
	n	%	n	%
<i>Microsporum canis</i>	21	96,77	9	100,0
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i>	1	3,23	-	-
Total	22	100,0	9	100,0

Nessa investigação, 23 raças de cães foram representadas. As raças mais representativas com dermatofitose foram Yorkshire Terriers (35,5%), Poodles (14,3%) Doberman Pinschers (11,8%). Gatos da raça persa foram mais frequentemente representados com dermatofitose (50%).

Com relação aos estudos referentes às características macromorfológicas das cepas de *M. canis*, isoladas durante o estudo, observaram-se três tipos diferentes de colônias: a- algodonosas baixas, apiculadas e com pigmento amarelo canário; b- colônias algodonosas baixas, apiculadas e sem pigmento amarelo canário; c- colônias algodonosas altas sem pigmento amarelo canário (Tabela 4).

Com relação aos estudos referentes às características fisiológicas das cepas de *M. canis*, isoladas durante o estudo, observou-se que todas as cepas apresentaram perfuração de pêlo *in vitro* positivas, bem como urease positivas, quanto às provas de requerimentos nutricionais observou-se que todas as cepas cresceram bem em todos os tubos.

Tabela 4: Macromorfologia das cepas de *M. canis* isoladas de cães e gatos em ágar batata e ágar Sabouraud

Nome do animal	Espécie	Macromorfologia em ágar batata	Macromorfologia em ágar Sabouraud
1	Canina	a	b
2	Canina	b	c
3	Canina	c	c
4	Felina	c	c
5	Canina	c	c
6	Canina	c	c
7	Felina	b	b
8	Felina	a	c
9	Canina	b	c
10	Canina	a	a
11	Canina	a	c
12	Canina	c	c
13	Canina	b	c
14	Felina	a	a
15	Felina	b	b
16	Canina	b	b
17	Canina	b	c
18	Felina	b	c
19	Canina	c	c
20	Canina	a	a
21	Canina	b	b
22	Felina	c	c
23	Canina	c	c
24	Felina	b	b
25	Canina	b	c
26	Canina	b	a
27	Canina	c	c
28	Canina	b	c
29	Canina	c	c
30	Felina	a	b

a- colônias algodonosas baixas, apiculadas e com pigmento amarelo canário

b- colônias algodonosas baixas, apiculadas e sem pigmento amarelo canário

c- colônias algodonosas altas e sem pigmento amarelo canário

7.2 Análise da estocagem

Das 172 cepas de dermatófitos de origem animal estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses), nos estoques ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C), apenas 68 cepas apresentaram-se viáveis durante o processo de recuperação (tabela 5).

Tabela 5. Descrição dos resultados da viabilidade das cepas de dermatófitos em BHI e em ágar-batata

Resultado em BHI	Resultado em ágar-batata			Total
	Viável	Não-viável	Contaminou	
Cresceu em 5 dias	39	--	--	39
Cresceu até 7 dias	29	--	--	29
Não cresceu até 7 dias	--	71	4	75
Contaminou	--	--	29	29
Total	68	71	33	172

Foram realizadas observações diárias para verificar o crescimento de micélio nos tubos contendo BHI. Os resultados encontrados demonstram que a partir do 7º dia de observação dos tubos as cepas que não apresentaram crescimento fúngico visível nos tubos contendo BHI foram consideradas não viáveis; este resultado pode ser confirmado através da do repique do material em BHI para tubos contendo ágar batata.

Das 57 cepas do estoque com DMSO 10% apenas 7 (12,28%) apresentaram-se viáveis. Foram analisadas 52 (91,23%) cepas de *M. canis*, das quais 3 (5,77%) cepas se apresentaram viáveis e 49 (94,23%) não cresceram. Foram analisadas 4 (7,02%) cepas de *T. mentagrophytes* e todas estavam viáveis (100%). Apenas 1 (1,75%) cepa de *M. gypseum* se encontrava nesse estoque e não cresceu (tabela 6).

Das 24 cepas do estoque com glicerol 100%, 17 (70,83%) cepas apresentaram-se viáveis. Foram analisadas 17 (70,83%) cepas de *M. canis*, das quais 10 (58,82%) cepas se apresentaram viáveis e 7 (41,18%) não cresceram. Foram analisadas 2 (8,33%) cepas de *T. mentagrophytes* e todas estavam viáveis (100%). Foram analisadas 3 (12,5%)

cepas de *M. gypseum* e todas estavam viáveis (100%). Foram analisadas 2 (8,33%) cepas de *T. tonsurans* e todas estavam viáveis (100%) (tabela 6).

Das 15 cepas do estoque em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores apenas 1 (6,67%) cresceu durante o processo de recuperação. Foram analisadas 12 (80%) cepas de *M. canis*, das quais 100% das cepas não se apresentaram viáveis. Foram analisadas 2 (13,33%) cepas de *T. mentagrophytes* e 1 (50%) cresceu. Apenas 1 (6,67%) cepa de *M. gypseum* se encontrava nesse estoque e não cresceu (tabela 6).

Das 76 cepas do estoque em salina a 25° C: 43 (56,58%) cresceram, 4 (5,26%) não cresceram, e 29 (38,16%) contaminaram. Foram analisadas 61 (80,26%) cepas de *M. canis*, das quais 31 (50,82%) se apresentaram viáveis, 4 (6,56%) não cresceram, e 26 (42,62%) estavam contaminadas. Foram analisadas 8 (10,53%) cepas de *T. mentagrophytes* das quais 7 (87,5%) cresceram e 1 (12,5%) contaminou. Foram analisadas 5 (6,58%) cepas de *M. gypseum* das quais 4 (80%) cresceram e 1 (20%) contaminou. Foram analisadas 2 (2,63%) cepas de *T. tonsurans* das quais 1 (50%) cresceu e 1 (50%) contaminou (tabela 6).

Tabela 6. Resultado em BHI, em relação às espécies e ao tipo de estoque

Espécie	Tipo de estoque	Resultado em BHI no sétimo dia			Total
		Cresceu	não cresceu	contaminou	
<i>M.canis</i>	DMSO 10%	3	49	--	52
	Sem crioprotetor	--	12	--	12
	Glicerol 100%	10	7	--	17
	Salina 25° C	31	4	26	61
	Total	44	72	26	142
<i>T.mentagrophytes</i>	DMSO 10%	4	--	--	4
	Sem crioprotetor	1	1	--	2
	Glicerol 100%	2	--	--	2
	Salina 25° C	7	--	1	8
	Total	14	1	1	16
<i>M.gypseum</i>	DMSO 10%	--	1	--	1
	Sem crioprotetor	--	1	--	1
	Glicerol 100%	3	--	--	3
	Salina 25° C	4	--	1	5
	Total	7	2	1	10
<i>T.tonsurans</i>	Glicerol 100%	2	--	--	2
	Salina 25° C	1	--	1	2
	Total	3	--	1	4

OBS: DMSO 10%, Sem crioprotetor, Glicerol 100%: estoques à -20° C. Salina: estoque à 25° C.

Para as cepas de *M. canis* os estoques em Glicerol 100% a -20° C e em Salina a 25° C obtiveram um maior percentual de viabilidade que os demais métodos de estocagem analisados. Não houve diferença, estatisticamente significativa, na comparação destes dois tipos de estoque ($p=0,5949$) Porém, no estoque em Salina a 25° C o percentual de contaminação é maior do que no estoque em Glicerol 100% ($p=0,0004$), assim como no estoque DMSO ($p=0,0000$) e no estoque sem crioprotetor ($p=0,0059$). Para as demais cepas, devido ao reduzido tamanho amostral, não foi possível realizar comparações.

Para facilitar a visualização destes dados, nos gráficos 1 e 2 encontram-se demonstrados os resultados de viabilidade obtidos em BHI, de cada espécie de dermatófito estudada em relação aos tipos de estoque em que elas se encontravam.

Gráfico 1. Resultado em BHI, do *M. canis* e *M.gypseum* em relação ao tipo de estoque

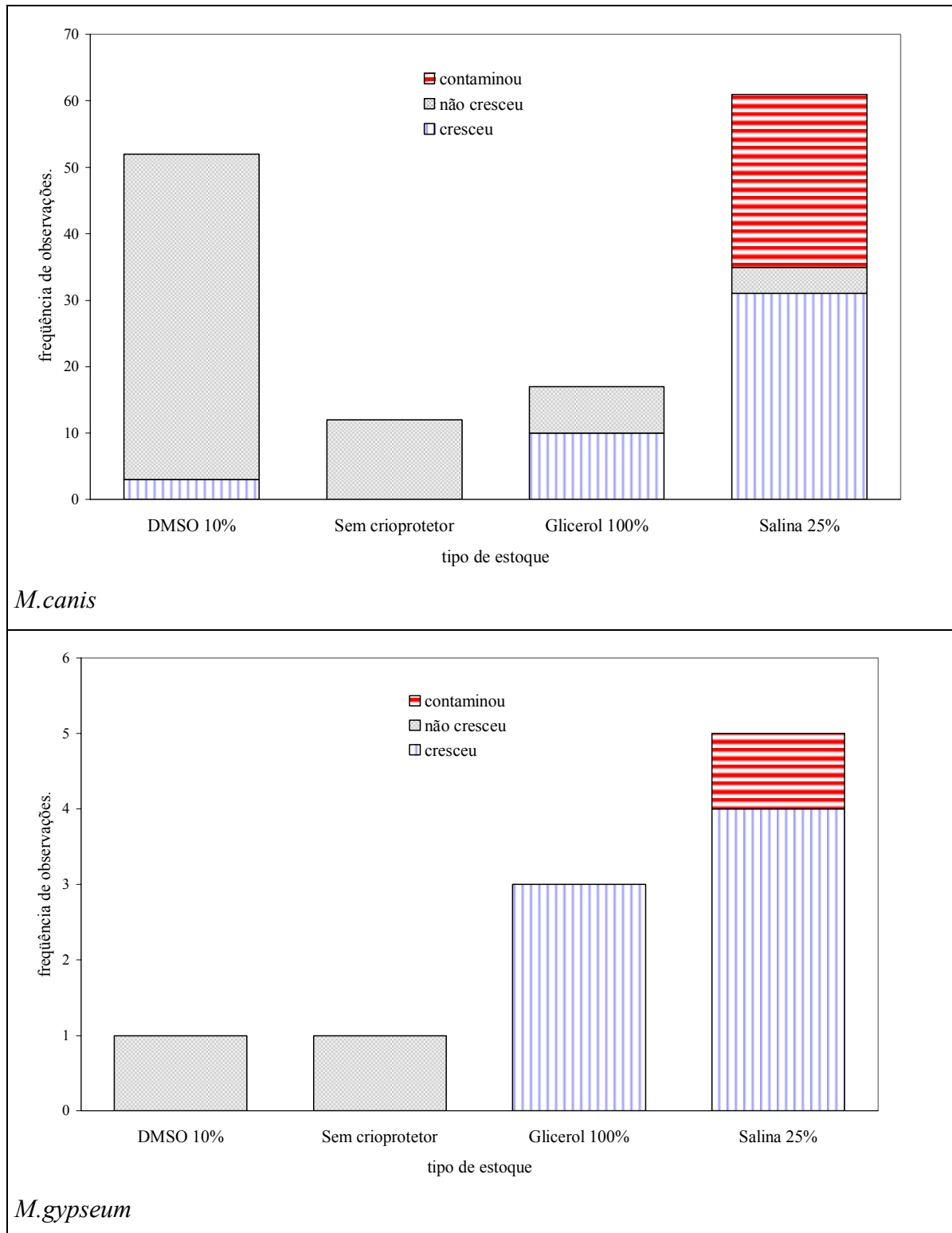
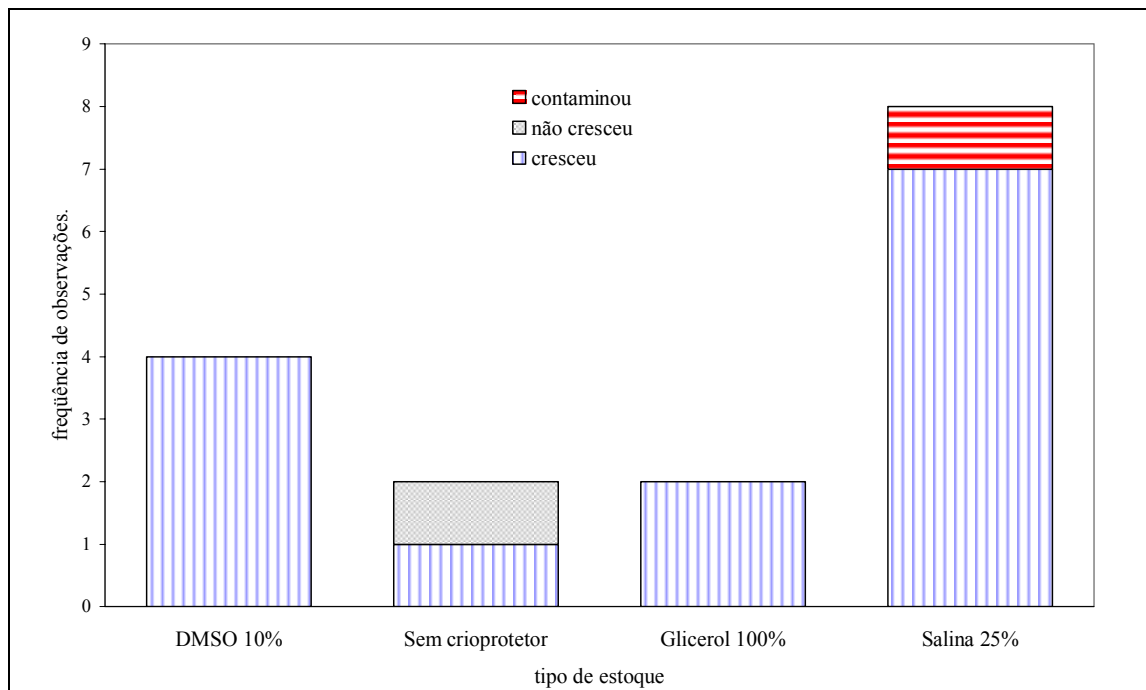
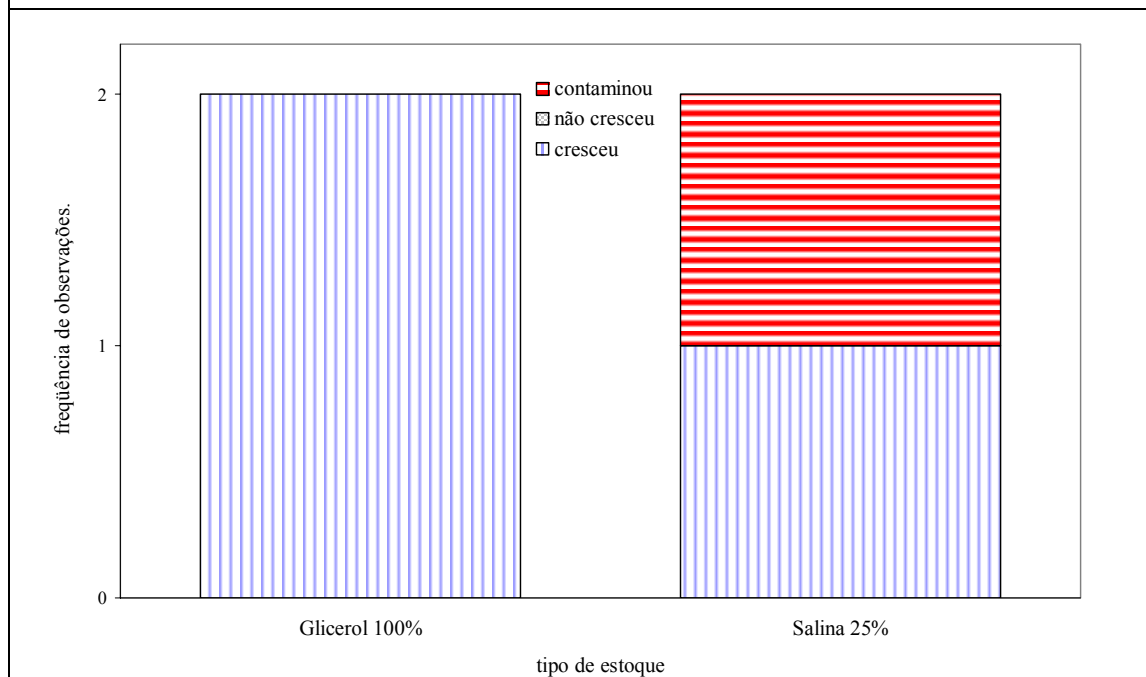


Gráfico 2. Resultado em BHI, do *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* em relação ao tipo de estoque



T. mentagrophytes



T. tonsurans

Os resultados de viabilidade encontrados em BHI, apresentam diferenças para cada espécie em relação aos diferentes períodos de estocagem. Bem como em relação aos métodos de estocagem (tabela 7).

Tabela 7. Estatísticas do tempo de estocagem (meses), em relação às espécies, ao tipo de estoque e resultado observado no sétimo dia em BHI

Espécie	Tipo de estoque	Resultado	n° de cepas	Média do tempo de estocagem	desvio-padrão
<i>M.canis</i>	DMSO 10%	Cresceu	3	18	8,96
		Não cresceu	49	32	6,85
	Sem crioprotetor	Não cresceu	12	34	0,39
	Glicerol 100%	Cresceu	10	14	3,12
		Não cresceu	7	12	0,53
	Salina 25° C	Cresceu	31	31	10,22
		Não cresceu	4	32	6,93
		Contaminou	26	22	10,81
	<i>T.mentagrophytes</i>	DMSO 10%	Cresceu	4	25
Sem crioprotetor		Cresceu	1	32	--
		Não cresceu	1	22	--
Glicerol 100%		Cresceu	2	16	4,95
Salina 25° C		Cresceu	7	23	8,69
		Contaminou	1	22	--
<i>M.gypseum</i>	DMSO 10%	Não cresceu	1	34	--
	Sem crioprotetor	Não cresceu	1	35	--
	Glicerol 100%	Cresceu	3	15	3,46
	Salina 25° C	Cresceu	4	20	9,91
		Contaminou	1	32	--
	<i>T.tonsurans</i>	Glicerol 100%	Cresceu	2	12
Salina 25° C		Cresceu	1	13	--
		Contaminou	1	12	--

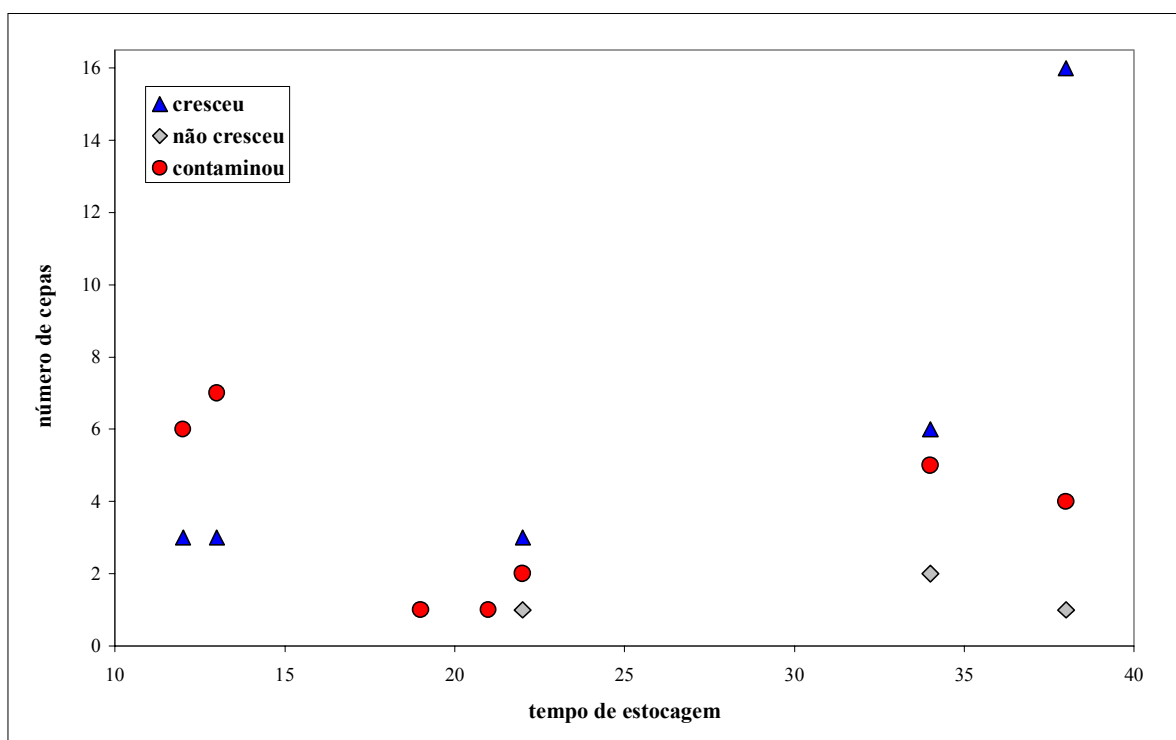
As cepas de *M. canis*, no estoque DMSO 10%, que foram viáveis possuem um tempo de estocagem inferior às que não foram viáveis ($p=0,016$). Ou seja, as cepas de *M. canis* que se encontravam estocadas em DMSO 10% a menos tempo apresentaram maior viabilidade que as cepas que estavam mantidas a mais tempo neste tipo de estoque (tabela 6). No estoque Glicerol 100% ($p=0,133$), assim como no estoque salina 25% ($p=0,708$) essa diferença não foi estatisticamente significativa. As demais comparações, devido ao reduzido tamanho amostral, não serão possíveis.

As cepas de *M. canis*, no estoque Salina 25° C, que foram viáveis, possuem um tempo de estocagem superior às que contaminaram ($p=0,002$), porém a distribuição dos tempos analisados indicam que existe algum outro fator interferindo na contaminação,

pois a maioria das cepas que cresceram possuem tempo de estocagem de 38 meses (maior tempo observado) e muitos dos que contaminaram possuem tempo de estocagem até 19 meses, havendo dois valores de maior concentração, em relação aos tempos de estocagem das cepas com contaminação, em que ambos estão próximos aos extremos dos tempos observados. Podendo ainda ser destacado o baixo índice de cepas não-viáveis.

Para facilitar a visualização destes dados, no gráfico 3 encontram-se demonstrados a distribuição de freqüência do tempo de estocagem (meses), em relação à espécie, *M. canis* no tipo de estocagem Salina 25° C e resultados de viabilidade e contaminação dessas cepas em BHI.

Gráfico 3. Distribuição de freqüência do tempo de estocagem (meses), em relação à espécie, *M. canis* no tipo de estocagem Salina 25° C e resultado observado dia em BHI



Com relação aos estudos referentes às características fisiológicas das cepas de *M. canis*, isoladas durante o estudo, observou-se que todas as cepas apresentaram perfuração de pêlo *in vitro* positivas, bem como urease positivas, quanto às provas de requerimentos nutricionais observou-se que todas as cepas cresceram bem em todos os tubos.

8. DISCUSSÃO

As dermatofitoses vêm sendo estudadas e descritas em todo o mundo. A frequência com que os dermatófitos são isolados varia de acordo com a distribuição geográfica, fatores ambientais, idade, sexo e raça, bem como com a existência de variação durante as diferentes estações climáticas (CABAÑES, 2000).

O *M. canis* é o responsável pela maioria de casos de micoses em cães e gatos e o mais freqüente dermatófito zoofílico de humanos, em diversas áreas urbanas da Europa (SYMPANYA & BAXTER 1996; CABAÑES, 2000; BRAJAC *et al.*, 2004; CAFARCHIA *et al.*, 2004; KOUSSIDOU-EREMONDI *et al.*, 2005), na América do Norte (RIPPON, 1988; MORIELLO & DEBOER, 1991) e na América Latina (SILVA *et al.*, 2003) sendo incluída nestas análises as regiões brasileiras (GAMBALE 1987; BRILHANTE *et al.*, 2003)

Na região Sudeste do Brasil, o *M. canis* foi o fungo mais isolado em dermatofitoses de pequenos animais, seguido de *Trichophyton mentagrophytes* e *M. gypseum* (GAMBALE, 1987, GAMBALE, 1993). Na região Nordeste os dermatófitos acometeram 13,16% dos cães e 27,27% dos gatos avaliados na pesquisa, sendo o gênero *Microsporum* o mais isolado (CAVALCANTI *et al.*, 2003). Dados semelhantes foram encontrados em nossa região (BRILHANTE *et al.*, 2003). Estes dados não diferem do diagnóstico humano, onde CHINELLI *et al.*, 2003 e BRILHANTE *et al.*, 2004b, apontam o *M. canis* como o zoofílico mais isolado em *Tinea capitis* na cidade de São Paulo e Fortaleza, respectivamente.

No presente estudo 15,35% dos animais com lesões sugestivas de dermatofitose foram positivos para esta infecção. Essa prevalência é muito variável na literatura pois estudos mostram que a frequência de dermatofitoses em cães pode variar de 7 a 40%, e de 9 a 46% em gatos (LEWIS, 1991; CABAÑES *et al.*, 1997; BRILHANTE *et al.*, 2003; CAFARCHIA *et al.*, 2004). Esses dados reforçam a importância da realização de um diagnóstico adequado, constando de pesquisa direta e cultura, antes de se instaurar o tratamento.

Nesta pesquisa os gatos foram infectados em 32,14% dos casos, e os cães em 12,64% dos casos. Diversos estudos sobre as dermatofitoses felina e canina demonstram que os cães apresentam uma menor prevalência de dermatofitose que os gatos (ROMANO *et al.*, 1997; BRILHANTE *et al.*, 2003; KHOSRAVI & MAHMOUDI,

2003). Este fato está relacionado ao fato que os felinos podem ser considerados reservatórios de *M. canis* por isso uma maior prevalência da infecção nesses animais (PIER & MORIELLO, 1998). Vários autores relatam a importância dos animais assintomáticos, pois estes são portadores silenciosos de fungos dermatofíticos, o que dificulta o rompimento do ciclo epidemiológico da doença (SYMPANYA & BAXTER, 1996; CABAÑES, 2000). Os resultados encontrados durante esta pesquisa corroboram com essa tese, uma vez que os gatos foram infectados em 100% dos casos por *M. canis*; nos cães o *M. canis* foi responsável por 96,77% e *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* (3,23%).

Quanto à idade mais favorável para infecções por fungos dermatofíticos, em pequenos animais, inúmeros relatos indicam que cães e gatos de menos de um ano de idade são os mais sensíveis. Este fato pode ser justificado, em parte, pela falta de maturidade imunológica, pela baixa produção de ácidos graxos de cadeia saturada, dentre outros fatores (CABAÑES, 2000; SILVA *et al.*, 2003; BRILHANTE *et al.*, 2003, CAFARCHIA *et al.*, 2004). Em nosso estudo dos 174 cães estudados, 64 tinham menos que 1 ano de idade e destes, 10 (15,63%) foram positivos para dermatófitos. 108 cães apresentavam mais que 1 ano de idade, dos quais 12 (11,11%) foram positivos para dermatófitos. Entre os gatos, dos 28, 16 tinham menos que 1 ano de idade, e destes 7 (43,75%) foram positivos para dermatófitos. Doze gatos tinham mais que 1 ano de idade, e destes somente 2 (16,67%) foram positivos para dermatófitos. Dados semelhantes foram encontrados por KHOSRAVI & MAHMOUDI, 2003, onde não foram observadas diferenças significativas entre cães com menos que um ano de idade e cães com mais de um ano de idade.

Em relação às raças, pode ser observada maior prevalência em cães da raça Yorkshire Terrier e Poodle e gatos da raça Persa (CABAÑES, 1997; CABAÑES, 2000; LEWIS, 1991; SPARKER *et al.*, 1994; BRILHANTE *et al.*, 2003, CAFARCHIA *et al.*, 2004). As razões para a predisposição de tais raças, ainda, não são bem claras. Possivelmente os pelos alongados facilitam as condições ótimas de temperatura e umidade para que as estruturas fúngicas fiquem protegidas contra a dissecação, favorecendo assim a sua propagação (SPARKES *et al.*, 1993; CAFARCHIA *et al.*, 2004). Esta hipótese se contradiz com o trabalho de KANWAR & BELHAJ, (1987), em dermatofitose humana, onde discutem que pêlos mais curtos, em casos de *Tinea capitis*, beneficiariam a implantação e instalação de artroconídios.

Durante o estudo epidemiológico, 23 raças de cães foram representadas. As raças mais representativas com dermatofitose foram Yorkshire Terriers (35,5%), Poodles (14,3%) Doberman Pinschers (11,8%). Gatos da raça persa foram mais frequentemente acometidos por dermatofitose (50%).

A respeito da sazonalidade das espécies fúngicas, muitos dados são contraditórios, pois autores, como BAXTER (1973), não descrevem dados de mudanças da flora dermatofítica de acordo com as estações anuais. Por outro lado, autores como LEWIS (1991) postulam diferenças entre o aumento da frequência de *M. gypseum* em períodos de verão. Estes dados concordam com trabalho de KAPLAN & IVENS (1961), onde estes autores reportaram que a frequência de *M. gypseum*, nos Estados Unidos da América, é mais evidente em zonas mais quentes do sul do País do que em regiões do norte. MANCIANTI *et al.*, (2002), em estudo desenvolvido durante 15 anos na Itália, observaram que houve uma distribuição anual das dermatofitoses em cães, onde o *M. gypseum* se destacou em temperaturas mais quentes como as do verão, enquanto o *M. canis*, em gatos, foi mais isolado no outono e inverno. Já o *T. mentagrophytes* não demonstrou predileção por nenhuma estação do ano (MANCIANTI *et al.*, 2002). Outros trabalhos também sugerem que há uma maior prevalência de dermatófitos no outono e no inverno (SPARKES *et al.*, 1993).

Nesta pesquisa, em relação à frequência de isolados contendo *M. canis* observada durante os meses de estudo, não se pode sugerir que exista uma correlação significativa entre umidade relativa do ar, a temperatura, a precipitação das chuvas e o número de animais com suspeita clínica de dermatofitose, nem entre esses fatores e o percentual de animais positivos para dermatofitoses, de acordo com dados obtidos através da Fundação Cearense de Meteorologia e Recursos Hídricos (FUNCEME) durante o período de realização do estudo epidemiológico. Resultados semelhantes foram encontrados em nossa região por BRILHANTE *et al.*, (2003), no qual os dermatófitos foram mais abundantes no primeiro semestre (meses Março, Abril e Maio), embora sua incidência sazonal não apresentou significativa variação na cidade de Fortaleza- CE.

Para a realização do estudo relacionado à estocagem foram utilizadas cepas que estavam estocadas em períodos diferentes na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil. As cepas isoladas durante o estudo epidemiológico não foram utilizadas no estudo sobre

estocagem de dermatófitos, devido ao fato de que em 2004, BRILHANTE *et al.* analisaram o comportamento de cepas de *M. canis* estocadas em 5 protocolos distintos por um período de 3, 6 e 9 meses: em ágar batata a - 20 °C; ágar batata acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO; 10%) a - 20 °C; ágar batata acrescido de glicerol (10%) a - 20 °C; salina com óleo mineral a 25 °C; salina a 25 °C. Na presente investigação houve o interesse em se avaliar a estocagem de cepas de dermatófitos que se encontravam estocadas por mais de 12 meses na micoteca do CEMM.

Com isso, para avaliação da estocagem de cepas de dermatófitos de origem animal, foram analisados os estoques de 172 cepas de dermatófitos isolados de cães e gatos, sendo: 142 cepas de *Microsporum canis*, 10 cepas de *Microsporum gypseum*, 16 cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e 4 cepas de *Trichophyton tonsurans*. As cepas foram estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses) na micoteca do CEMM em ágar batata incubado em freezer a - 20° C acrescido de DMSO 10%, ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C).

Poucas são as fontes literárias à disposição para comparação e aprofundamento de métodos de estocagem em microorganismos, mais raro ainda em se tratando de fungos. Técnicas antigas e convencionais como estocagem em solo ou em solução salina, ou, técnicas mais modernas como a crioconservação com diferentes substâncias também mostram uma disparidade muito grande já que os fungos utilizados são muito variados, bem como as substâncias crioconservadoras, temperaturas e protocolos de estocagem (BUENO & GALLARDO, 1998).

É importante, contudo, ressaltar a necessidade de pesquisas mais especializadas, incluindo a avaliação dos perfis genéticos ao longo da estocagem, tendo em vista que algumas alterações ou mutações genéticas podem ocorrer devido ao estresse de estocagem ao qual as cepas são submetidas sem que as mesmas sejam expressadas em modificações fenotípicas aparentes, mas em padrões outros de avaliação das células fúngicas.

Os resultados deste estudo indicam as cepas de dermatófitos das espécies *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. tonsurans*, podem ser mantidas por períodos de até 38 meses em freezer a -20° C, bem como em salina acrescida de óleo mineral a 25° C. Dados de literatura indicam que essas espécies de dermatófitos podem manter-se satisfatoriamente viáveis por períodos de até 10 anos em diferentes

métodos de preservação, demonstrando que esses fungos quando manipulados adequadamente resistem à estocagem (DESHMUKH, 2004).

Em relação ao *M. canis*, observou-se uma menor taxa de viabilidade que as demais espécies supracitadas, sendo os melhores resultados obtidos nos estoques em ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20° C e em salina a 25° C. Um estudo realizado em nossa região utilizando cepas de *M. canis* analisou o comportamento desse dermatófito em ágar batata a - 20 °C; ágar batata acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO; 10%) a - 20 °C; ágar batata acrescido de glicerol (10%) a - 20 °C; salina com óleo mineral a 25 °C; salina a 25 °C. Os resultados encontrados mostraram uma variação no percentual de viabilidade das cepas de *M. canis* dependendo do método de estocagem a que ele foi submetido, tendo inclusive obtendo taxa de 100% de morte de cepas de *M. canis* quando estocadas em agar batata acrescido de glicerol 10% por um período de 9 meses (BRILHANTE *et al.*, 2004).

Ainda em relação ao estudo realizado por Brilhante et al., 2004, as cepas de *M. canis* estocadas em agar batata acrescido de DMSO 10% obtiveram boa recuperação após nove meses de estocagem. Em nossa pesquisa encontramos que após 12 meses de estocagem neste mesmo método de estoque as cepas de *M. canis* não apresentaram viabilidade, indicando que o fator tempo deve ser levado em consideração quando da escolha de um método para estocagem de cepas de *M. canis*.

No estoque salina a 25° C observou-se uma grande taxa de contaminação. As cepas de *M. canis*, neste estoque, que se encontravam contaminadas, apresentaram-se distribuídas ao longo de todo o período (12-38 meses). Estes dados demonstram não é o tempo de estocagem e sim outros fatores que estão interferindo na eficácia dessa técnica. Estudos demonstram que alguns grupos de fungos podem manter-se viáveis por longos períodos quando estocados pelo método Castellani (BUENO & GALLARDO, 1998; BRILHANTE *et al.*, 2004). Esse é um método extremamente fácil e barato para a preservação de diversas espécies fúngicas, e é bastante utilizado por não necessitar de estrutura especial para sua realização (TADDEI *et al.*, 1999).

Apesar das facilidades da realização dessa técnica, o crescimento fúngico ocorre lentamente podendo levar a mudanças morfofisiológicas, bem como, à deteriorização das cepas, além da contaminação (QIANGQIANG & JIAJUN, 1998).

Nossos resultados demonstram que, com exceção as cepas de *M. canis*, os dermatófitos de origem animal podem ser preservados em todos os métodos de estocagem avaliados durante essa pesquisa. Já as cepas de *M. canis*, ainda são

necessários mais estudos a fim de que se possa recomendar um método ideal para sua preservação por longos períodos. Portanto, recomenda-se que cada isolado seja mantido em pelo menos dois métodos de estocagem a fim de garantir uma boa taxa de recuperação dessas cepas.

9. CONCLUSÕES

- Os dados encontrados nesta pesquisa evidenciaram que o *M. canis* ainda é o agente etiológico mais frequentemente isolado de cães e gatos em nossa região;
- Os gatos foram mais frequentemente acometidos por dermatofitose quando comparado aos cães;
- Os resultados sugerem que gatos com idade inferior à 1 ano foram os mais frequentemente acometidos por dermatofitose, entretando esse fato não se aplica aos cães estudados;
- A sazonalidade não interfere na incidência de dermatófitos na região do estudo epidemiológico;
- Os estoques ágar batata acrescido com glicerol 100% (-20° C) e salina acrescida de óleo mineral (25° C) foram os que apresentaram maior índice de viabilidade de cepas de *M. canis*;
- A contaminação mais elevada foi observada no estoque salina acrescida de óleo mineral (25° C), demonstrando que são necessários cuidados quando da realização deste método, a fim de minimizar esse problema;
- O maior índice de cepas inviáveis, independente do método de estocagem, foi em relação ao *M. canis*, o que evidencia a necessidade de mais estudos em relação à escolha de um método mais eficaz para garantir uma boa recuperação dessa espécie de dermatófito.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AIZAWA, T.; KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATANABE, S.; HASEGAWA, A. Molecular heterogeneity in clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Veterinary Microbiology**, v. 70, p. 67-75, 1999.
2. AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* with special reference to canine skin disease. **British Veterinary Journal**, v. 152, n. 3, p. 269-281, 1996.
3. BAXTER, M. Ringworm due to *Microsporum canis* in cats and dogs in New Zealand. **The New Zealand Veterinary Journal**. 21: 33-37. 1973.
4. BENAROUDJ, N.; LEE, D.H.; GOLDBERG, A.L. Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. **J. Biol. Chem.** v. 276, n. 26, p. 24261-24267, 2001.
5. BIDAULT, N.P.; HAMMER, B.E.; HUBEL A. Rapid MR imaging of crioprotectant permeation in an engineered dermal replacement. **Criobiology**, v. 40, p. 13-26, 2000.
6. BRAJAC, I.; STOJNIC-SOSA, L.; PRPIC, L.; LONCAREK, K.; GRUBER, F. The epidemiology of *Microsporum canis* infections in Rijeka area, Croatia **Mycoses**. 47:222-6. 2004.
7. [BRILHANTE, R.S.; CAVALCANTE, C.S.; SOARES-JUNIOR, F.A.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.; ROCHA, M.F.](#) High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. **Mycopathologia**, v. 156, n. 4, p. 303-308. 2003.
8. BRILHANTE, R.S.N.; CAVALCANTE, C.S.P.; SOARES-JUNIOR, F.A.; MONTEIRO, A.J.; BRITO, E.H.S.; CORDEIRO, R.A.; SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. Evaluation of *Microsporum canis* in different methods of storage. **Medical Mycology**, v. 42, p. 499-504, 2004.

9. BRILHANTE, R.S, N.; CORDEIRO, R.A.; ROCHA, M.F.G.; MONTEIRO, A.J.; MEIRELES, T.E.; SIDRIM, J.J.C. *Tinea capitis* in a dermatology center in the city of Fortaleza, Brazil: the role of *Trichophyton tonsurans* **International Journal of Dermatology** 43: 575-9. 2004b.
10. BROWN, A. D. Compatible solutes and extreme water stress in eukariotic microorganisms. **Advances in Microbial Physiology**, v. 17, p. 181-242, 1978.
11. BROWSE, J.; XIN, Z. Temperature Sensing and Cold Acclimation. **Curr. Opin. Plant. Biol.**, v. 4, p. 241–246, 2001.
12. BUENO, L.; GALLARDO, R. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 166-168, 1998.
13. BUNSE, T.; STEIGLEDER, G.K. The preservation of fungal cultures by lyophilization. **Micoses**, v. 34, p. 173-176, 1991.
14. CABAÑES, F.J; ABARCA, L. M; BRAUGULAT, M. R. Dermatophytes isolated from domestic animals in Barcelona, Spain. **Mycopathologia**, v. 137, p. 107-113, 1997.
15. CABAÑES, F.J. Dermatofosis animales. Recientes avances. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. 8-12, 2000.
16. CAFARCHIA, C.; ROMITO, D.; SASANELLI, M.; LIA, R.; CAPELLI, G.; OTRANTO D The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy **Mycoses**. 47: 508-13. 2004.
17. CARLOTTI, D. N.; BESINGNOR, E. Dermatophytosis due *Microsporum persicolor* (13 cases) or *Microsporum gypseum* (20 cases) in dogs. **Veterinary Dermatology**, 10(1): 17-27,1999.

18. CARLTON, W.W.; MCGAVIN, M.D. Patologia Veterinária especial de thomson. Porto Alegre, Artmed, p672, 1998.
19. CAVALCANTI, M. P.; FAUSTINO, M.A.G.F.;FILHO, J.B.G.; ALVES, L.C. Frequência de dermatófitos e fungos saprófitas em caninos e felinos com sintomatologia sugestiva de dermatopatia micótica atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. **Clínica Veterinária**. 43. 24-30. 2003.
20. CHINELLI, P.A.; SOFIATTI, A. D.E. A.; NUNES, R.S.; MARTINS, J.E. Dermatophyte agents in the city of Sao Paulo, from 1992 to 2002 **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. 45(5):259-63. 2003.
21. CLIQUET, S.; JACKSON, M. A. Influence of culture conditions on production and freeze-drying tolerance of *Paecilomyces fumosoroseus* blastospores. **Journal of Industrial Microbiology & Biotecnology**, v. 23, p. 97-102, 1999.
22. CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Atypical Lipid-Dependent *Malassezia* Species Isolated from Dogs with Otitis Externa. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 6, p. 2383- 2385, 2000.
23. CROAN, S.C. Lyophilization of hypha-forming tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. **Mycologia**, v. 92, p. 810-817, 2000.
24. CROAN, S. C.; BURDSALL, H. H.; RENTMEESTER, R. M. Preservation of tropical wood-inhabiting Basidiomycotina. **Mycologia**, v. 91, p. 908-916, 1999.
25. CROWE, J.H.; CROWE, L.M.; CARPENTER, J.F.; RUDOLPH, A.S.; AURELL WISTROM, C.; SPARGO, B.J.; ANCHODORGUY, T.J. Interactions of sugars with membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 947, p. 367-384, 1988.
26. DAEMEN, A. L. H.; VAN DER STEGE, H. J. 1 - The destruction of enzymes and bacteria during the spray drying of milk and whey. 2 - The effect of the drying conditions. **Neth. Milk Dairy J.**, v. 36, p. 211–229, 1982.

27. DAHL, M.V. Dermatophytosis and the immune response. **Journal of Am. Acad. Dermatol.**, v. 31, p. 34-41, 1994.
28. DAY, J.G. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. McLellan M.R. (Eds.), Humana Press, ISBN: 0-89603-296-5, v. 38. 1995.
29. DESHMUKH, S.K. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. **Mycoses**, v. 46, p. 203-207, 2003.
30. DOAN CH.; DAVIDSON PM 2000. Microbiology of potatoes and potato products: a review. *J Food Prot* 63(5): 668-683.
31. DUMET, D.; ENGELMANN, F.; CHABRILLANGE, N.; DUVAL, Y.; DEREUDDRE, J. Importance of sucrose for the acquisition of tolerance to desiccation and cryopreservation of oil palm somatic embryos. **Cryo-Letters**, v. 14, p. 243-250, 1993.
32. ESPINEL- INGROFF A, MONTEIRO D, MARTIN-MAZUELOS E. Long term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J Clin Microbiol* 42: 1257-1259.2004.
33. FOIL, C.S. **Dermatophytosis**. In: Greene, CE, ed. Infectious Diseases of the dog and cat. Philadelphia: W.B. Saunders, 362-70, 1998.
34. GAMBALE, W.; CORREA, B.; PAULA, C.R.; PURCHIO, A.; LARSSON, C. E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. **Ver. Fac. Med Vet Zootec.**, v. 24, p. 187-191, 1987.
35. GAMBALE, W.; LARSSON, C,E.; MORITAMI, M.M. Dermatophytes and other fungi of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. **Feline Practice – Fungal Parasitology**. 21: 29-32, 1993.

36. GARCIA, M. E.; BLANCO, J. L. Principales enfermedades fúngicas que afetam a los animales domésticos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 17, p. S2-S7, 2000.
37. GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 3, p. 229-233, 2004.
38. GRÄSER, Y.; EL FARI, M.; STERRY, W.; TIETZ, H. J. Identification of common dermatophytes (*Trichophyton*, *Microsporum* *Epidermophyton*) using polymerase chain reactions. **British Journal of Dermatology**, v. 138, p. 576-582, 1998.
39. GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. Some like it cold: response of micro-organisms to cold shock. **Arch. Microbiol.** v. 166, p. 293-300, 1996.
40. GROB, M. La parade cellulaire aux variations thermiques. **La Recherche**, v. 317, p. 82-86, 1999.
41. GUILLOT, J.; LATIÉ, L.; MANJULA, D. *et al.*, Evaluation of the dermatophyte test medium Rapid Vet-D. **Veterinary Dermatology**. 12: 123-7. 2001.
42. HAY, R. J. **Dermatophytosis and other superficial mycoses**. En: Mandell, G. L.; Bennet, J. E.; Dolin, R. Principles and practice of infectious disease. 4^a Ed. London, p. 2375-2386, 1995.
43. HIRSH, A. G. Vitrification in plants as a natural form of cryoprotection. **Cryobiology**, v. 24, p. 214-228, 1987.
44. HOEKSTRA, F. A.; HAIGH, A. M.; TETTEROO, F. A. A.; ROEKEL, T. V. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance in cauliflower seeds. **Seed Sci Res.**, v. 4, p. 143-147, 1994.

45. HORACZEK, A.; VIERNSTEIN, H. Comparison of three commonly used drying technologies with respect to activity and longevity of aerial conidia of *Beauveria brongniartii* and *Metarhizium anisopliae*. **Biological Control**, v. 31, p. 65–71, 2004.
46. HUBÁLEK, Z. Cryopreservation of Microorganisms at Ultra-low Temperatures. **Praga, Academia Praha, Czech Republic**, 286 p., 1996.
47. HUBÁLEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, Review, v. 46, p. 205–229, 2003.
48. IMANISHI, H. T.; SUZUKI, T.; MASUDA, K.; HARADA, T. Accumulation of raffinose and stachyose in shoot apices of *Lonicera caerulea* L. during cold acclimation. **Scientia Horticulturae**, v. 72, p. 255-263, 1998.
49. KANWAR, A.J.; BELHAJ, M.S. *Tinea capitis* in Benghazi, Libya. **International Journal of Dermatology** 26: 371-373. 1987.
50. KAPLAN, W. ; IVENS, M.S. **Sabouraudia** 1: 91. 1961.
51. KHOSRAVI, A. R.; MAHMOUDI, M. Dermatophytes isolated from domestic animals in Iran. **Mycoses**, v. 46, p. 222-225, 2003.
52. KIRSOP, B.E.; DOYLE, A. Maintenance of Microorganisms and Cultured Cells: a manual of laboratory methods. Second ed., **Academic Press**, London, 1991.
53. KNASMMÜLLER, S.; PARZEFALL, W.; HELMA, C.; KASSIER, F.; ECKER, S.; SCHULTE, H. R. Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment. **Crit. Ver. Toxicol.**, v. 27, p. 495-537 , 1997.
54. KOUSSIDOU-EREMONDI, T.; DEVLIOU-PANAGIOTIDOU, D.; MOURELLOU-TSATSOU, O.; MINAS, A. Epidemiology of dermatomycoses in children living in Northern Greece 1996-2000. **Mycoses**. 48:11-6. 2005.

55. KRAMER, P. J.; BOYER, J. S. Water relations of plants and soils. **Academic Press**, San Diego, CA, p. 495, 1995.
56. KULESHOVA, L. L.; MACFARLANE, D. R.; TROUNSON, A. O.; SHAW, M. Sugars exert a major influence on the vitrification properties of ethylene glycol-based solutions and have a low toxicity to embryos and oocytes. **Cryobiology**, v. 38, p. 119-130, 1999.
57. KANO, R.; NAKAMURA, Y.; WATARI, T. Identification of clinical isolated of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum* by random amplification polymorphic DNA (RAPD) and Southern hybridization analyses. **Mycoses**, v. 41, p. 139-143, 1998.
58. LACAZ, C. S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E. M.; MELO, N. T. **Guia para identificação. Fungos Actinomicetos Algas de interesse médico**. São Paulo, Ed. Sarvier, 445 p., 1998.
59. LARA-HERRERA, I.; MATA, G.; GAITAN-HERNANDÉZ, R. Evaluación del efecto de la criopreservación de cepas de *Pleurotus* spp. sobre la producción de carpóforos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 44-47, 1998.
60. LEWIS, D.T.; FOIL, C.S.; HOSGOOD, G. Epidemiology and clinical features of dermatophytosis in dogs and cats at Louisiana State University: 1981-1990. **Veterinary Dermatology**, v. 2, p. 53-58, 1991.
61. LIEBERMANN, J.; NAWROTH, F.; ISACHENKO, V.; ISACHENKO, E.; RAHIMI, G.; TUCKER, M. J. Minireview: Potential Importance of Vitrification in Reproductive Medicine. **Biology of Reproduction**, v. 67, p. 1671-1680, 2002.
62. LOPES, A.J.; CAPONE, D.; JANSEN, J. M. Aspergilosis pulmonares. **Pulmão RJ**, v. 13, p. 34-44, 2004.

63. LOVELOCK, J. E.; BISHOP, M. W. H. Prevention of freezing damage to living cells by dimethylsulphoxide. **Nature**, v. 183, p. 1394–1395, 1959.
64. MACIEL, A.S.; VIANA, J.A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão. **Clínica Veterinária**, 57: 74-82. 2005.
65. MANCIANTI, F.; NARDONI, S.; CECCHI, S.; CORAZZA, M.; TACCINI, F. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period **Mycopathologia**. 156:13-8.2002.
66. MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and applications. **Am. J. Physiol.**, v. 247, p. 125–142, 1984.
67. MC GINNIS, M.R.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L. Storage of stock cultures of filamentous fungi, yeasts and some aerobic Actinomycetes in sterile distilled water. **Appl. Microbiology**, v. 28, p. 218-222, 1974.
68. MENDLEAU, L.; RISTIC, Z. Diagnosing dermatophytosis in dogs and cats. *Veterinary Medicine*, 87(11): 1086-1091, 1992.
69. MENDLEAU, L.; HNILICA, K. A. **Dermatologia de pequenos animais: Atlas colorido e guia terapêutico**. 1^a Ed. Roca, 2003.
70. MILLANTA, F.; PEDONESE, F.; MANCIANTI, F. Relationship between *in vivo* and *in vitro* activity of terbinafine against *Microsporum canis* infection in cats. **J. Mycol. Méd.**, v. 10, p. 30-33, 2000.
71. MORIELLO K.A.; DEBOER DJ. Fungal flora of the hair coat of cats with and without dermatophytosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology** 29: 285-292. 1991.
72. MORIELLO KA. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology** 15: 99-107.2004.

73. ODDS, F. C. Long-term laboratory preservation of pathogenic yeasts in water. *J. Med. Vet. J. Basic Microbiol.; Mycol.*, v. 29, n. 6, p. 413-5, 1991.
74. OLIVARES, R. A. C. Ringworm Infection in Dogs and Cats. In: [Recent Advances in Canine Infectious Diseases](#). Carmichael L. (Ed.), **International Veterinary Information Service**, Ithaca NY, (www.ivis.org). Document no. A0113.0603, 2003.
75. OLIVER, M. J. Desiccation tolerance in vegetative plant cells. **Physiol Plant.**, v. 97, p. 779-787, 1996.
76. PANOFF, J. M.; THAMMAVONGS, B.; GUEGUEN, M.; BOUTIBONNES, P. Cold stress response in mesophilic bacteria. **Cryobiology**, v. 36, p. 75–83, 1998.
77. PANOFF, J. M.; THAMMAVONGS, B.; LAPLACE, J. M.; HARTKE, A.; BOUTIBONNES, P.; AUFRAY, Y. Cryotolerance and cold adaptation in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403. **Cryobiology**, v. 32, p. 516–520, 1995.
78. PASARELL, L.; MC GINNIS, M. R. Viability of fungal culture maintained at – 70 °C. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, p. 1000-1004, 1992.
79. PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, p. 175–180, 1999.
80. PIER, A.C.; MORIELLO, K.A. Parasitic relationship between *Microsporium canis* and the cat. **Medical Mycology** 36: 271-275, 1998.
81. PIER, A. C.; SMITH, J. M. B.; ALEXIOU, H.; ELLIS, D. H.; LUND, A.; PRITCHARD, R. C. Animal ringworm – its aetiology, public health significance and control. **J. Med. Vet. Mycol.**, v. 32, p. 133-150, 1994.
82. PIÉRARD, G. E.; ARRESE, J. E.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C. Treatment and prophylaxis of *Tinea* infections. **Drugs**, v. 52, p. 209-224, 1996.

83. PINHEIRO, A.Q., MOREIRA, J.L.B., SIDRIM, J.J.C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 30(4):287-294,1997.
84. POLGE, C.; SMITH, A. U.; PARKES, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. **Nature**, v. 164, p. 666, 1949.
85. QUIANGQIANG, Z.; JIAJUN, W. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. **Micoses**, v. 41, p. 255-257, 1998.
86. RIPPON, J. W. **Medical micology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomicetes**. 3^a Ed., Philadelphia : W.B Saunders Company, 1988.
87. ROCHETE, F., ENGELEN, M., VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. **Journal of the Veterinary Pharmacology Therapy**, 26(1): 31-53, 2003.
88. RODRIGUEZ, E. G.; LÍRIO, V.; LACAZ, C. S. Preservação de fungos e actinomicetos de interesse médico em água destilada. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 34, p. 159-165, 1992.
89. ROMANO, C.; VALENTI, L.; BARBARA R. Dermatophytes isolated from asymptomatic stray cats. **Mycoses**. 40: 471-472, 1997.
90. RYAN, M. J., JEFFRIES, P., BRIDGE, P.D., SMITH, D. Developing cryopreservation protocols to secure fungal gene function. **Cryo Lett.**, 22:115-124, 2001.
91. SAKAI, A. Cryopreservation of germplasm of woody plants. In YPS Bajaj, ed, **Biotechnology in agriculture and forestry**, v. 32, Cryopreservation of plant germplasm I, Springer-Verlag, Berlin, Heiderlberg, New York, p. 53-69, 1995.

92. SAKAI, A.; YOSHIDA, S. The role of sugar and related compounds in variations of freezing resistance. **Cryobiology**, v. 5, p. 160-174, 1968.
93. SAMUEL KIM, S.; BATTAGLIA, D. E.; SOULES, M. R. The future of human ovarian cryopreservation nad transplantation: fertilit and beyond. **Fertility and sterility**, v. 75, 2001.
94. SANTOS, I.R.I. Criopreservação de germoplasma vegetal: a alternativa para a conservação a longo prazo. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 20 - maio/junho, 2001.
95. SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E *et al.* Fungal skin diseases. In : Muller and kirks Small Animal Dermatology. 6 ed. Philadelphia: WB. Saunders. 336-361, 2001.
96. SHARMA, B.; SMITH, D. Recovery of fungi after storage for over a quarter of a century. **World Journal of Microbiology & biotechnology**, v. 15, p. 517-519, 1999.
97. SHAW, J. M.; ORANRATNACHHAI, A.; TROUNSON, A. O. Fundamental criobiology of mammalian oocytes and ovarian tissue. **Teriogenology**, v. 53, p. 59-72, 2000.
98. SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Ed. Guanabara Koogan, 1ª Edição, 2004.
99. SILVA, A. M. M.; BORBA, C. M.; OLIVEIRA, P. C. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. **Mycoses**, v. 37, p. 165-169, 1994.
100. SILVA, V.; THOMSON, P.; MAIER, L.; ANTICEVIC S. Dermatophyte infection and colonization in dogs from South Santiago, Chile. **Revista Iberoamericana de Micologia**. 20:145-8. 2003.

101. SIMPANYA, M.F.; BAXTER, M. Isolation of fungi from pelage of cats and dogs using the hairbrush technique. **Mycopathologia**, v. 134, p. 129-133, 1996.
102. SMITH D.; RYAN MJ. Current status of fungal collections and their role in biotechnology In: Handbook of fungal biotechnology Ed) pp 527-538. Marcel Dekker, New York. 2003.
103. SPARKES, A.H.; WERRETT, G.; STOKES, C.R.; GRUFFYDD-JONES, T.J. *Microsporium canis*: innapparent carriage by cats and the viability of arthrospores. **Journal Small Animal Practice** 35: 397-401, 1994.
104. SUTTON, D. A.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G. Guide to Clinically Significant Fungi. 1st ed. **Williams & Wilkins**, Baltimore, 1998.
105. SYMOENS, F.; NOLARD, N. Biodiversité des microorganismes: aspects legaux et role des collections. **J. Mycol. Med.**, v. 9, p. 49-51, 1999.
106. TADDEI, A.; MILAGROS, M. T.; CAPRILES, C. H. Viability studies on actinomycetes. **Mycopathologia**, v. 143, p. 161-164, 1999.
107. TAKAHASHI, I. Current types of human dermatophytoses transmitted from animal. **Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi**, v. 44, n. 4, p. 245-7, 2003.
108. THAMMAVONGS, B.; CORROLER, D.; PANOFF, J.M.; AUFRAY, Y.; BOUTIBONNES, P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing thawing challenge. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, p. 398-402, 1996.
109. THAMMAVONGS, B.; PANOFF, J.M.; GUEGUEN, M. Phenotypic adaptation to freeze-thaw stress of the yeast-like fungus *Geotrichum candidum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 60, p. 99-105, 2000.
110. THIERINGER, H. A.; JONES, P. G.; INOUYE, M. Cold shock and adaptation. **Bioessays**, v. 20, p. 49-57, 1998.

111. TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Ed. Artmed. 6^a edição, 2000.
112. VERTUCCI, C. W.; FARRANT, J. M. Acquisition and loss of desiccation tolerance. Seed development and germination, **J Kigel, G Galili, eds**, Marcel Dekker Inc., New York, p. 237-271, 1995.
113. VIANI, F.C; DOS SANTOS, J.I.; PAULA, C.R.; LARSSON, C.E & GAMBALE, W. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role virulence. **Medical Mycology** 39: 463-8. 2001.
114. ZAITZ C., Dermatofitoses. In: ZAITZ, C., CAMPBELL, I., MARQUES, S.A., RUIZ, L.R.B., SOUZA, V.M. Compêndio de micologia médica. Rio de Janeiro, MEDSI, p. 81- 98, 1998.
115. ZRIMSEK, P., KOS, J., PINTER, L., DROBNIC-KOSOROK, M. Detection by ELISA of the humoral immune response in rabbits naturally infected with *Trichophyton mentagrophytes*. **Veterinary Microbiology**, 70(1-2): 77-86,1999.

ANEXO I

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Preservação de dermatófitos em diferentes métodos de estocagem

[Preservation of dermatophytes in different methods of storage]

CSP CAVALCANTE*, RSN BRILHANTE*, EHS BRITO*, RA CORDEIRO*/***, AJ
MONTEIRO**, J JC SIDRIM*, MFG ROCHA**.

Faculdade de Veterinária, Pós Graduação em ciências Veterinárias *Centro Especializado em Micologia Médica, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal **Departamento de Estatística e Matemática Aplicada, Universidade Federal do Ceará Rua Monsenhor Furtado, s/n, 60430-350, Fortaleza, CE, Brasil ***Departamento de Biologia, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil

Autor para correspondencia: C. S. P. CAVALCANTE. Rua José Barcelos, 66; São Gerardo. CEP: 60.450-510. Fortaleza, CE, Brasil. Tel: 55 (085) 3283-2780. E. mail: carolinaspc@yahoo.com.br

Abstract

The main objective of this investigation was to evaluate different methods of storage for strains of *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *T. tonsurans*, isolated from dogs and cats. A total of 172 strains of dermatophytes were maintained in different methods of storage, such as potato agar at -20° C; potato agar added to 10% dimethyl-sulfoxide at -20° C; potato agar added to glycerol (100%) at -20° C and saline with a mineral-oil layer 25° C. The strains were stored, em diferentes períodos desde March/2002 (38 months) to May/2004 (12 months). The results suggest that to ensure optimal viability each *M. canis* isolate maintained should be held in at least two methods of storage, potato agar added to glycerol (100%) at -20° C and saline with a mineral-oil layer 25° C; and that all methods of storage can be used for preservation of others dermatophytes.

Key words: dermatophytes, *Microsporum* sp, *Trichophyton* sp, storage

Resumo

O objetivo principal desta investigação foi avaliar diferentes métodos de estocagem para cepas de *Microsporum canis*, *M. gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *T. tonsurans*, isolados de cães e gatos. O total de 172 cepas de dermatófitos foram mantidas em ágar batata a -20° C sem adição de crioprotetores, ágar batata acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO) 10% a -20° C, ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas a 25° C. As cepas estavam estocadas em diferentes períodos desde Março/2002 (38 meses) a Maio/2004 (12 meses). Os resultados sugerem para garantir a viabilidade cada cepa de *M. canis* deve ser mantida em pelo menos dois dos métodos de estocagem, ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas a 25°; e todos os métodos de estocagem podem ser utilizados para preservação das outras espécies de dermatófitos.

Palavras-chave: dermatófitos, *Microsporum* sp, *Trichophyton* sp, estocagem

Introdução

Para que seja realizado um estudo satisfatório da microbiota fúngica à longo prazo, é necessário que se escolha um método de estocagem das cepas isoladas adequado, haja vista, que elas serão usadas como subsídios na observação da ocorrência de alterações fenotípicas e genotípicas desses microrganismos (Knasmüller et al. 1997, Millanta et al. 2000).

Muitos protocolos vem sendo sugeridos para preservação de cepas fúngicas, entretanto nenhuma delas se aplica a todas as espécies fúngicas (Espinel-Ingroff et al. 2004). O estoque de fungos isolados de processos infecciosos apresenta grande importância, pois muitas vezes esses agentes apresentam crescimento lento e escasso, acarretando em um difícil isolamento das cepas (Doan & Davidson 2000).

Todas as técnicas possuem vantagens e desvantagens, e nenhuma delas tem sido correlacionada pela literatura especializada como uma forma definitiva para garantir 100% de viabilidade das cepas após o período de estocagem (Silva et al. 1994, Brilhante et al. 2004).

Novas técnicas de estocagem visam adequar o melhor método de preservação para cada fungo, possibilitando metodologias espécie-específicas, e, vislumbrando a preservação de cepas a longo prazo, seja em temperatura ambiente ou em freezer. Atualmente, boa parte dos bancos de coleções faz uso de pelo menos duas metodologias de estocagem, visando garantir a viabilidade e manutenção das cepas (Brilhante et al. 2004, Girão et al. 2004).

Com isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a viabilidade de cepas de quatro espécies dermatófitos, oriundos de cães e gatos, estocadas em períodos diferentes, em diversos métodos de estocagem.

Material e Métodos

Microorganismos. Foram analisados os estoques de 172 cepas de dermatófitos isolados de cães e gatos, sendo: 142 cepas de *Microsporum canis*, 10 cepas de *Microsporum gypseum*, 16 cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes*, e 4 cepas de *Trichophyton tonsurans*. As cepas foram estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses) na micoteca do Centro Especializado em Micologia Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Brasil.

Métodos de estocagem. Dentre as 172 cepas de dermatófitos estocadas na micoteca do CEMM, 57 se encontravam em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, 24 em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, 15 em ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e 76 cepas de dermatófitos estavam mantidas em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C).

Recuperação das cepas. As cepas, de cada um de seus diferentes estoques, tiveram um fragmento da colônia repicado para tubos contendo 2ml de BHI em caldo e incubados em temperatura ambiente (25° C). Os tubos foram observados diariamente por um período de até 10 dias, a fim de verificar o crescimento do micélio. Após esse período as cepas foram transferidas para tubos contendo ágar batata onde foi confirmada a viabilidade das cepas.

Resultados

Das 172 cepas de dermatófitos de origem animal estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses), nos estoques ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C), apenas 68 cepas apresentaram-se viáveis durante o processo de recuperação (tabela 1).

Foram realizadas observações diárias para verificar o crescimento de micélio nos tubos contendo BHI. Os resultados encontrados demonstram que a partir do 7° dia de observação dos tubos as cepas que não apresentaram crescimento fúngico visível nos tubos contendo BHI foram consideradas não viáveis; este resultado pode ser confirmado através da do repique do material em BHI para tubos contendo ágar batata.

Das 57 cepas do estoque com DMSO 10% apenas 7 (12,28%) apresentaram-se viáveis. Foram analisadas 52 (91,23%) cepas de *M. canis*, das quais 3 (5,77%) cepas se apresentaram viáveis e 49 (94,23%) não cresceram. Foram analisadas 4 (7,02%) cepas de *T. mentagrophytes* e todas estavam viáveis (100%). Apenas 1 (1,75%) cepa de *M. gypsum* se encontrava nesse estoque e não cresceu (tabela 2).

Das 24 cepas do estoque com glicerol 100%, 17 (70,83%) cepas apresentaram-se viáveis. Foram analisadas 17 (70,83%) cepas de *M. canis*, das quais 10 (58,82%) cepas se apresentaram viáveis e 7 (41,18%) não cresceram. Foram analisadas 2 (8,33%) cepas de *T. mentagrophytes* e todas estavam viáveis (100%). Foram analisadas 3 (12,5%) cepas de *M. gypseum* e todas estavam viáveis (100%). Foram analisadas 2 (8,33%) cepas de *T. tonsurans* e todas estavam viáveis (100%) (tabela 2).

Das 15 cepas do estoque em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores apenas 1 (6,67%) cresceu durante o processo de recuperação. Foram analisadas 12 (80%) cepas de *M. canis*, das quais 100% das cepas não se apresentaram viáveis. Foram analisadas 2 (13,33%) cepas de *T. mentagrophytes* e 1 (50%) cresceu. Apenas 1 (6,67%) cepa de *M. gypseum* se encontrava nesse estoque e não cresceu (tabela 2).

Das 76 cepas do estoque em salina a 25° C: 43 (56,58%) cresceram, 4 (5,26%) não cresceram, e 29 (38,16%) contaminaram. Foram analisadas 61 (80,26%) cepas de *M. canis*, das quais 31 (50,82%) se apresentaram viáveis, 4 (6,56%) não cresceram, e 26 (42,62%) estavam contaminadas. Foram analisadas 8 (10,53%) cepas de *T. mentagrophytes* das quais 7 (87,5%) cresceram e 1 (12,5%) contaminou. Foram analisadas 5 (6,58%) cepas de *M. gypseum* das quais 4 (80%) cresceram e 1 (20%) contaminou. Foram analisadas 2 (2,63%) cepas de *T. tonsurans* das quais 1 (50%) cresceu e 1 (50%) contaminou (tabela 2).

Para as cepas de *M. canis* os estoques em Glicerol 100% a -20° C e em Salina a 25° C obtiveram um maior percentual de viabilidade que os demais métodos de estocagem analisados. Não houve diferença, estatisticamente significativa, na comparação destes dois tipos de estoque ($p=0,5949$) Porém, no estoque em Salina a 25° C o percentual de contaminação é maior do que no estoque em Glicerol 100% ($p=0,0004$), assim como no estoque DMSO ($p=0,0000$) e no estoque sem crioprotetor ($p=0,0059$). Para as demais cepas, devido ao reduzido tamanho amostral, não foi possível realizar comparações.

Para facilitar a visualização destes dados, nos gráficos 1 e 2 encontram-se demonstrados os resultados de viabilidade obtidos em BHI, de cada espécie de dermatófito estudada em relação aos tipos de estoque em que elas se encontravam.

Os resultados de viabilidade encontrados em BHI, apresentam diferenças para cada espécie em relação aos diferentes períodos de estocagem. Bem como em relação aos métodos de estocagem (tabela 3).

As cepas de *M. canis*, no estoque DMSO 10%, que foram viáveis possuem um tempo de estocagem inferior às que não foram viáveis ($p=0,016$). Ou seja, as cepas de *M. canis* que se encontravam estocadas em DMSO 10% a menos tempo apresentaram maior viabilidade que as cepas que estavam mantidas a mais tempo neste tipo de estoque (tabela 3). No estoque Glicerol 100% ($p=0,133$), assim como no estoque salina 25% ($p=0,708$) essa diferença não foi estatisticamente significativa. As demais comparações, devido ao reduzido tamanho amostral, não serão possíveis.

As cepas de *M. canis*, no estoque Salina 25° C, que foram viáveis, possuem um tempo de estocagem superior às que contaminaram ($p=0,002$), porém a distribuição dos tempos analisados indicam que existe algum outro fator interferindo na contaminação, pois a maioria das cepas que cresceram possuem tempo de estocagem de 38 meses (maior tempo observado) e muitos dos que contaminaram possuem tempo de estocagem até 19 meses, havendo dois valores de maior concentração, em relação aos tempos de estocagem das cepas com contaminação, em que ambos estão próximos aos extremos dos tempos observados. Podendo ainda ser destacado o baixo índice de cepas não-viáveis.

Para facilitar a visualização destes dados, no gráfico 3 encontram-se demonstrados a distribuição de frequência do tempo de estocagem (meses), em relação à espécie, *M. canis* no tipo de estocagem Salina 25° C e resultados de viabilidade e contaminação dessas cepas em BHI.

Discussão

Para avaliação da estocagem de cepas de dermatófitos de origem animal, foram analisados os estoques de 172 cepas de dermatófitos isolados de cães e gatos, sendo: 142 cepas de *Microsporum canis*, 10 cepas de *Microsporum gypseum*, 16 cepas de *Trichophyton mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e 4 cepas de *Trichophyton tonsurans*. As cepas foram estocadas em períodos diferentes de março/2002 (38 meses) a maio/2004 (12 meses) na micoteca do CEMM em ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de DMSO 10%, ágar batata incubado em freezer a -20° C acrescido de glicerol 100%, ágar batata incubado em freezer a -20° C sem adição de crioprotetores, e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas em temperatura ambiente (25° C).

Poucas são as fontes literárias à disposição para comparação e aprofundamento de métodos de estocagem em microorganismos, mais raro ainda em se tratando de

fungos. Técnicas antigas e convencionais como estocagem em solo ou em solução salina, ou, técnicas mais modernas como a crioconservação com diferentes substâncias também mostram uma disparidade muito grande já que os fungos utilizados são muito variados, bem como as substâncias crioconservadoras, temperaturas e protocolos de estocagem (Bueno & Gallardo 1998).

É importante, contudo, ressaltar a necessidade de pesquisas mais especializadas, incluindo a avaliação dos perfis genéticos ao longo da estocagem, tendo em vista que algumas alterações ou mutações genéticas podem ocorrer devido ao estresse de estocagem ao qual as cepas são submetidas sem que as mesmas sejam expressadas em modificações fenotípicas aparentes, mas em padrões outros de avaliação das células fúngicas.

Os resultados deste estudo indicam as cepas de dermatófitos das espécies *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* var. *mentagrophytes* e *T. tonsurans*, podem ser mantidas por períodos de até 38 meses em freezer a -20°C , bem como em salina acrescida de óleo mineral a 25°C . Dados de literatura indicam que essas espécies de dermatófitos podem manter-se satisfatoriamente viáveis por períodos de até 10 anos em diferentes métodos de preservação, demonstrando que esses fungos quando manipulados adequadamente resistem à estocagem (Deshmukh 2003).

A criopreservação é a técnica preferida em muitos bancos de microorganismos, pois as culturas mantêm a estabilidade por longos períodos devido a diminuição da atividade metabólica que ocorre nesta temperatura (Smith & Ryan 2003). Todos os organismos vivos possuem habilidade de responder às modificações de temperatura ambiental e de enfrentar as novas condições térmicas (Grob 1999).

A estocagem de cepas em ágar batata a -20°C ou -70°C pode ser feita com ou sem adição de crioprotetores. Entretanto, é descrito que a presença de um agente crioprotetor adequado aumenta a sobrevivência da célula consideravelmente (Hubálek 2003).

Em relação ao *M. canis*, observou-se uma menor taxa de viabilidade que as demais espécies supracitadas, sendo os melhores resultados obtidos nos estoques em ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C e em salina a 25°C . Um estudo realizado em nossa região utilizando cepas de *M. canis* analisou o comportamento desse dermatófito em ágar batata a -20°C ; ágar batata acrescido de dimetil-sulfóxido (DMSO; 10%) a -20°C ; ágar batata acrescido de glicerol (10%) a -20°C ; salina com óleo mineral a 25°C ; salina a 25°C . Os resultados encontrados mostraram uma variação

no percentual de viabilidade das cepas de *M. canis* dependendo do método de estocagem a que ele foi submetido, tendo inclusive obtendo taxa de 100% de morte de cepas de *M. canis* quando estocadas em agar batata acrescido de glicerol 10% por um período de 9 meses (Brilhante et al. 2004).

Ainda em relação ao estudo realizado por Brilhante et al. (2004), as cepas de *M. canis* estocadas em agar batata acrescido de DMSO 10% obtiveram boa recuperação após nove meses de estocagem. Em nossa pesquisa encontramos que após 12 meses de estocagem neste mesmo método de estoque as cepas de *M. canis* não apresentaram viabilidade, indicando que o fator tempo deve ser levado em consideração quando da escolha de um método para estocagem de cepas de *M. canis*.

No estoque salina a 25° C observou-se uma grande taxa de contaminação. As cepas de *M. canis*, neste estoque, que se encontravam contaminadas, apresentaram-se distribuídas ao longo de todo o período (12-38 meses). Estes dados demonstram não é o tempo de estocagem e sim outros fatores que estão interferindo na eficácia dessa técnica. Estudos demonstram que alguns grupos de fungos podem manter-se viáveis por longos períodos quando estocados pelo método Castellani (Bueno & Gallardo 1998, Brilhante et al. 2004). Esse é um método extremamente fácil e barato para a preservação de diversas espécies fúngicas, e é bastante utilizado por não necessitar de estrutura especial para sua realização (Taddei et al. 1999).

Apesar das facilidades da realização dessa técnica, o crescimento fúngico ocorre lentamente podendo levar a mudanças morfofisiológicas, bem como, à deteriorização das cepas, além da contaminação (Qiangqiang & Jiajun 1998).

Nossos resultados demonstram que, com exceção as cepas de *M. canis*, os dermatófitos de origem animal podem ser preservados em diferentes métodos de estocagem. Já as cepas de *M. canis*, ainda são necessários mais estudos a fim de que se possa recomendar um método ideal para sua preservação por longos períodos. Portanto, recomenda-se que cada isolado seja mantido em pelo menos dois métodos de estocagem a fim de garantir uma boa taxa de recuperação dessas cepas, ágar batata acrescido de glicerol 100% a -20°C e em solução salina acrescida de óleo mineral mantidas a 25°.

Referências Bibliográficas

Brilhante RSN, Cavalcante CSP, Soares-Júnior, FA, Monteiro AJ, Brito EHS, Cordeiro RA, Sidrim JJC, Rocha MFG 2004. Evaluation of *Microsporium canis* in different methods of storage. *Med Mycol* 42: 499-504.

Bueno L, Gallardo R 1998. Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. *Revista Iberoamericana de Micología* 15:166-168.

Deshmukh SK 2003. The maintenance and preservation of keratinophilic fungi and related dermatophytes. *Mycoses*, 46: 203-207.

Doan CH and Davidson PM 2000. Microbiology of potatoes and potato products: a review. *J Food Prot* 63(5): 668-683.

Espinel- Ingroff A, Monteiro D, Martin-Mazuelos E 2004. Long term preservation of fungal isolates in commercially prepared cryogenic microbank vials. *J Clin Microbiol* 42: 1257-1259.

Girão MD, Prado, MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG 2004. Viabilidade de cepas de *Malassezia pachydermatis* mantidas em diferentes métodos de conservação. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 37(3): 229-233.

Grob M 1999. La parade cellulaire aux variations thermiques. *La Recherche*, 317: 82–86.

Hubálek Z 2003. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology, Review*. 46: 205–229.

Knasmüller S, Parzefall W, Helma C, Kassier F, Ecker S, Schulte HR 1997. Toxic effects of griseofulvin: disease models, mechanisms, and risk assessment. *Crit Ver Toxicol* 27: 495-537..

Millanta F, Pedonese F, Mancianti F 2000. Relationship between *in vivo* and *in vitro* activity of terbinafine against *Microsporum canis* infection in cats. *J Mycol Méd.* 10: 30-33.

Quiangqiang Z, Jiajun W 1998. Storage of fungi using sterile distilled water or lyophilization: comparison after 12 years. *Micoses* 41: 255-257.

Silva AMM, Borba CM, Oliveira PC 1994. Viability and morphological alterations of *Paracoccidioides brasiliensis* strains preserved under mineral oil for long periods of time. *Mycoses* 37:165-169.

Smith D and Ryan MJ 2003. Current status of fungal collections and their role in biotechnology In: Handbook of fungal biotechnology Ed) pp 527-538. Marcel Dekker, New York

Taddei A, Milagros MT, Capriles CH 1999. Viability studies on actinomycetes. *Mycopathologia* 143:161-164.

Tabela 1. Descrição dos resultados da viabilidade das cepas de dermatófitos em BHI e em ágar-batata

Resultado em BHI	Resultado em ágar-batata			Total
	Viável	Não-viável	Contaminou	
Cresceu em 5 dias	39	--	--	39
Cresceu até 7 dias	29	--	--	29
Não cresceu até 7 dias	--	71	4	75
Contaminou	--	--	29	29
Total	68	71	33	172

Tabela 2. Resultado em BHI, em relação às espécies e ao tipo de estoque

Espécie	Tipo de estoque	Resultado em BHI no sétimo dia			Total
		creceu	não creceu	contaminou	
<i>M.canis</i>	DMSO 10%	3	49	--	52
	Sem crioprotetor	--	12	--	12
	Glicerol 100%	10	7	--	17
	Salina 25° C	31	4	26	61
	Total	44	72	26	142
<i>T.mentagrophytes</i>	DMSO 10%	4	--	--	4
	Sem crioprotetor	1	1	--	2
	Glicerol 100%	2	--	--	2
	Salina 25° C	7	--	1	8
	Total	14	1	1	16
<i>M.gypseum</i>	DMSO 10%	--	1	--	1
	Sem crioprotetor	--	1	--	1
	Glicerol 100%	3	--	--	3
	Salina 25° C	4	--	1	5
	Total	7	2	1	10
<i>T.tonsurans</i>	Glicerol 100%	2	--	--	2
	Salina 25° C	1	--	1	2
	Total	3	--	1	4

OBS: DMSO 10%, Sem crioprotetor, Glicerol 100%: estoques à -20° C. Salina: estoque à 25° C.

Gráfico 1. Resultado em BHI, do *M. canis* e *M. gypseum* em relação ao tipo de estoque

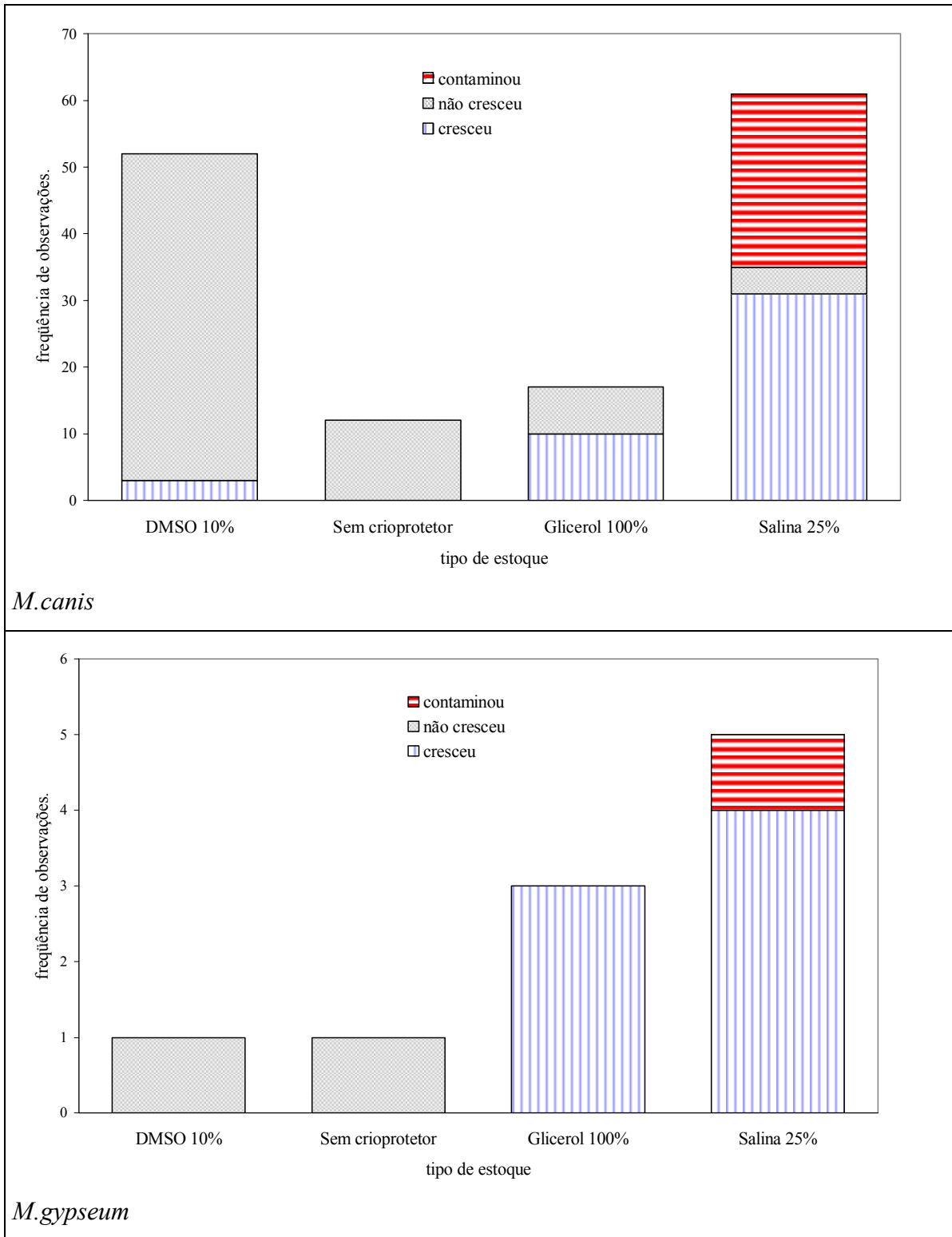
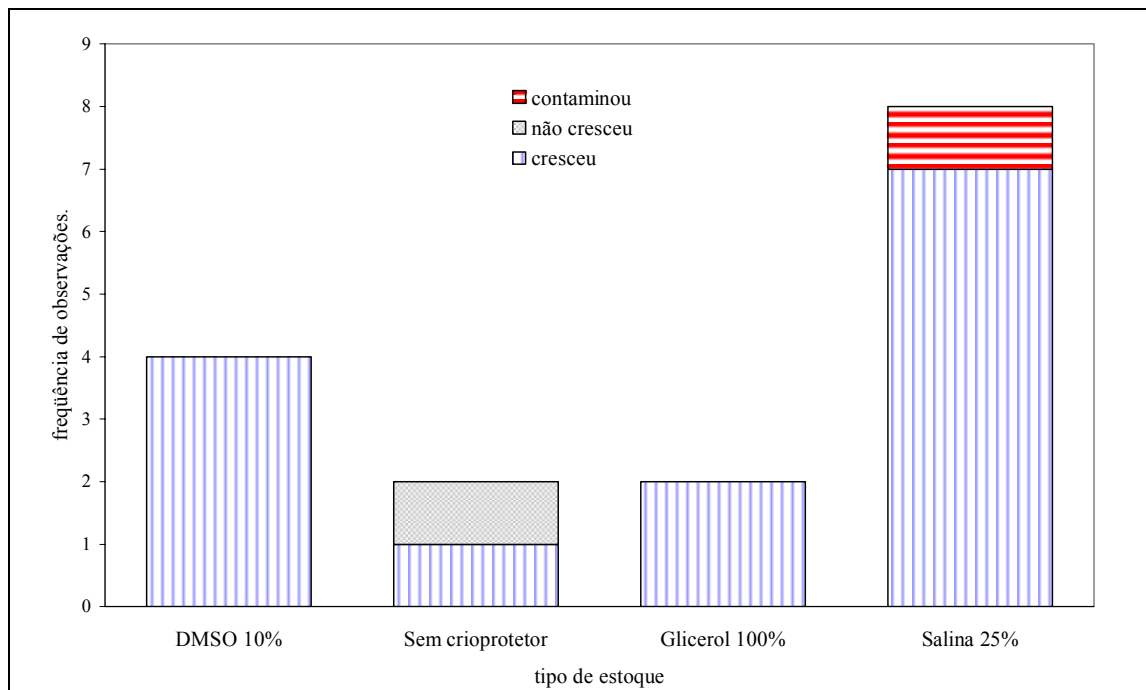
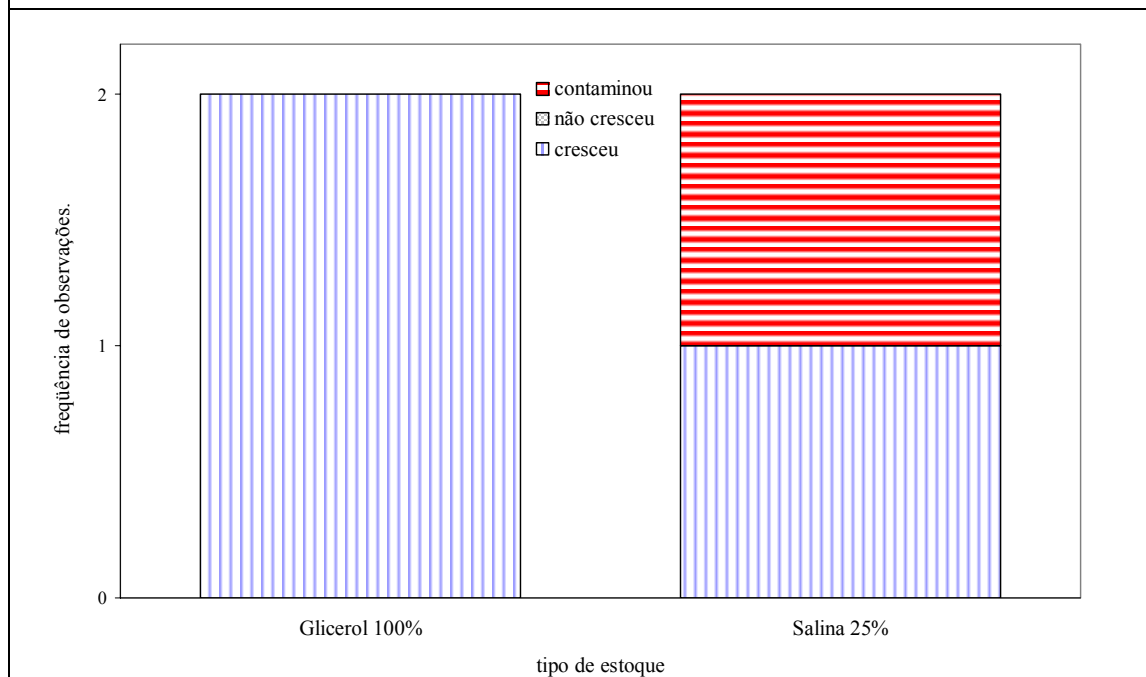


Gráfico 2. Resultado em BHI, do *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans* em relação ao tipo de estoque



T. mentagrophytes

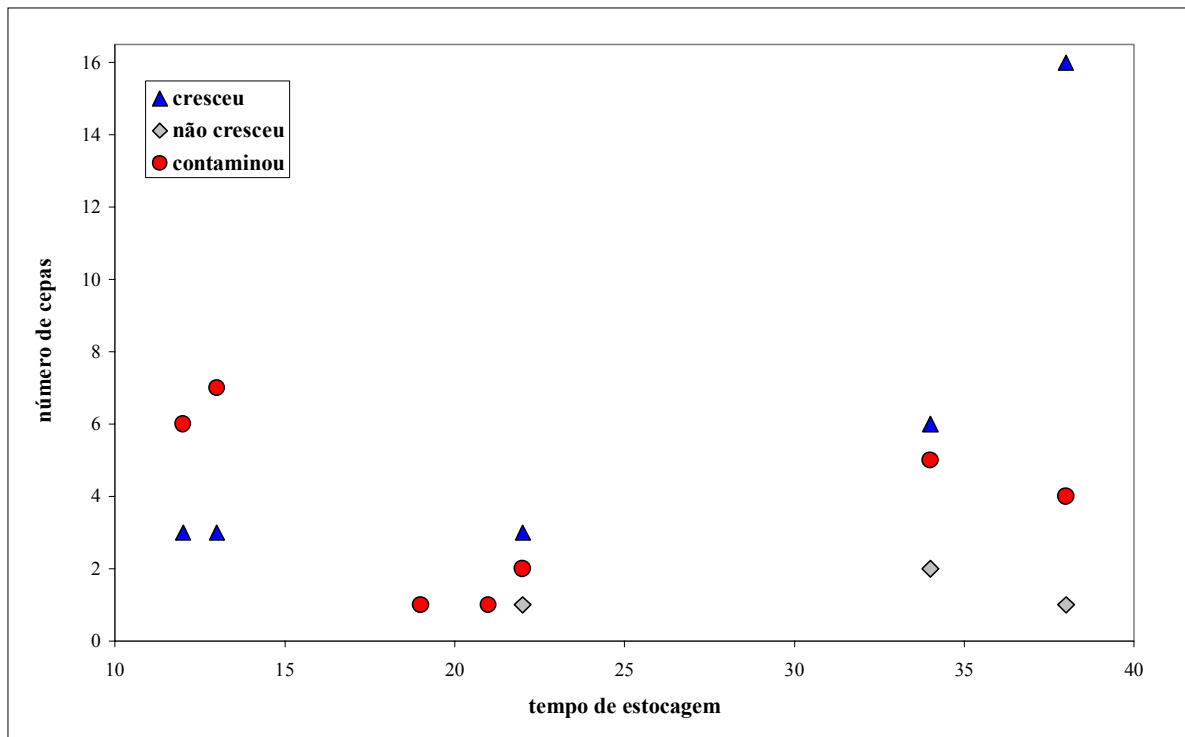


T. tonsurans

Tabela 3. Estatísticas do tempo de estocagem (meses), em relação às espécies, ao tipo de estoque e resultado observado no sétimo dia em BHI

Espécie	Tipo de estoque	Resultado	nº de cepas	média do tempo de estocagem	desvio-padrão
<i>M.canis</i>	DMSO 10%	creceu	3	18	8,96
		Não cresceu	49	32	6,85
	Sem crioprotetor	Não cresceu	12	34	0,39
	Glicerol 100%	creceu	10	14	3,12
		Não cresceu	7	12	0,53
	Salina 25%	creceu	31	31	10,22
		Não cresceu	4	32	6,93
contaminou		26	22	10,81	
<i>T.mentagrophytes</i>	DMSO 10%	creceu	4	25	8,62
	Sem crioprotetor	creceu	1	32	--
		Não cresceu	1	22	--
	Glicerol 100%	creceu	2	16	4,95
	Salina 25%	creceu	7	23	8,69
		contaminou	1	22	--
<i>M.gypseum</i>	DMSO 10%	Não cresceu	1	34	--
	Sem crioprotetor	Não cresceu	1	35	--
	Glicerol 100%	creceu	3	15	3,46
	Salina 25%	creceu	4	20	9,91
		contaminou	1	32	--
<i>T.tonsurans</i>	Glicerol 100%	creceu	2	12	0,71
	Salina 25%	creceu	1	13	--
		contaminou	1	12	--

Gráfico 3. Distribuição de frequência do tempo de estocagem (meses), em relação à



espécie, *M. canis* no tipo de estocagem Salina 25% e resultado observado dia em BHI



Anexo II

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ – UECE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS – PPGCV

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ – UFC CENTRO ESPECIALIZADO EM MICOLOGIA MÉDICA – CEMM

Nome do animal: _____ N° Identificação CEMM: _____

Proprietário: _____ Telefone: _____

Veterinário responsável: _____ Celular: _____

Clínica Veterinária: _____ Telefone: _____

DADOS EPIDEMIOLÓGICOS:

Idade: _____ Raça: _____ Pelagem: _____

Sexo Masc Fem Mora em Casa Aptº Contato com Areia Gatos Cães

Saudável ou Apresenta alguma patologia Banho Clínica Domicílio

Patologia oftálmica Olho esquerdo Olho direito Qual?: _____

Patologia dermatológica Não Sim Alopecia Prurido Eritema Pústula

Crostas Hiperqueratose Lesão: Seca Úmida Hiperpigmentada

Presença de otite?: Esquerda Direita Prurido Dor Eritema Secreção purulenta

Evolução da patologia: Aguda Crônica Tempo de evolução: _____

Já apresentou algum tipo de lesão dermatológica? Qual foi o diagnóstico e a conduta terapêutica?

Presença de outra patologia concomitante? _____

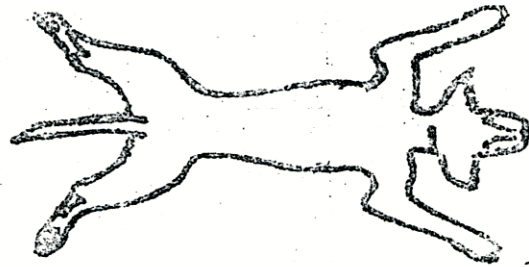
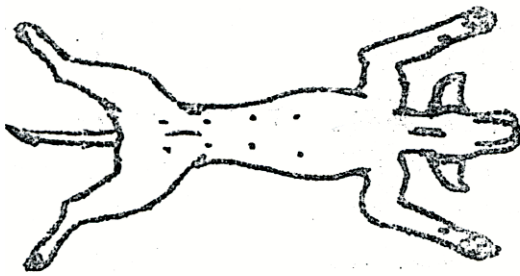
Qual? _____

Medicação em uso? _____ Qual?: _____

Data da colheita: ____ / ____ / ____ Suspeita Clínica: _____

Obs:

Localizar a lesão dermatológica nos desenhos abaixo:



Observações:

Preenchimento exclusivo do CEMM:

- Saudável
 Otite E
 Otite D
 Pat. Of. E
 Pat. Of. D
 Dermatite

Região anatômica	Coleta?		Exame direto			Cultura / Espécie isolada
	SIM	NÃO	0	1-10	>10	
Olho esquerdo						
Olho direito						
Ouvido esquerdo						
Ouvido direito						
Lesão Pele						
Axila Esquerda						
Inguinal Esquerda						

ANEXO III

Ficha de Identificação de dermatófitos

Nome Animal: _____ Proprietário: _____
Data de entrada: _____ ID do paciente: _____ Nº de coleção: CEMM

Macromorfologia das colônias

Relevo:
Apiculado Crateriforme Rugoso Cerebriforme

Textura:
Gabrosa Algodonosa Veludosa Furfurácea Penugenta Arenosa

Pigmento: Difusível Não difusível

Coloração _____ Coloração reverso _____

Micromorfologia (observado em 10 campos do bordo de crescimento; objetiva de 40X):

Macroconídio	O	1-5	5-10	>50
Microconídio	O	1-10	10-50	>50
Hifa estéril				

Estruturas de ornamentação: Clarnidoconidio Hifa pectinada Hifa em espiral
Hifa em raquete Candelabro Cabeça de prego Órgão nodular

Testes nutricionais

T1	0	+1	+2	+3	+4
T2	0	+1	+2	+3	+4
T3	0	+1	+2	+3	+4
T4	0	+1	+2	+3	+4
T5	0	+1	+2	+3	+4
T6	0	+1	+2	+3	+4
T7	0	+1	+2	+3	+4

Urease (em 7 dias): Positiva () Negativa ()

Perfuração do pêlo (em 40 dias): Positiva () Negativa ()

Espécie isolada: _____

Observações:

Término da identificação:

Identificador:

Data de envio para estoque: